

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Cátedra de Fisiología
Instituto de Química y Metabolismo del Fármaco
(IQUIMEFA-CONICET y UBA)

**ENDOTELINA-1 y -3: Efectos moduladores sobre el
transportador neuronal de noradrenalina en el hipotálamo de
rata. Receptores y vías intracelulares involucradas**

Tesis de Doctorado de la Universidad de Buenos Aires

Tesista: Bioquímica *Sandra Ingrid Hope*
Director: Prof. Dr. *Marcelo Sergio Vatta*

2016

*Para una voluntad firme, nada es imposible, no hay fácil ni difícil;
fácil es lo que ya sabemos hacer, difícil, es lo que aún no hemos
aprendido a hacer bien”*

Bernardo Houssay

Dedicado a mis padres, hermanos y en especial a mi hija y a Cyntia

Agradecimientos

A la Cátedra de Fisiología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires e Instituto de Química y Metabolismo del Fármaco (IQUIMEFA-UBA-CONICET) por permitir realizar este trabajo de Tesis.

Al Profesor Dr. Marcelo S. Vatta quien me enseñó, acompañó, dio consejos y me ayuda a ser mejor profesional y en especial mejor persona. Estoy agradecida por su confianza y sus enseñanzas tanto para investigar como para la vida.

A la Dra. Liliana Bianciotti por su apoyo, consejos y su estímulo permanente.

A la Universidad de Buenos Aires (UBA), al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANCYT) por solventar económicamente los experimentos realizados en el presente trabajo de tesis.

A mis compañeros y amigos Julia, Vanina y Mechi, por su amistad, por hacerme pasar momentos divertidos en estos años de trabajos y además fueron las manos tendidas que aliviaron los momentos amargos.

A mis amigos que siempre estuvieron a mi lado durante estos años y me dieron palabras de aliento.

A mi familia por inculcarme a que siempre hay que seguir adelante. A Cynthia por ser la brisa cálida de amor de las mañanas.

Y por último, pero no menos importante, a Carlos, por su paciencia, su apoyo incondicional, su amor que lo hicieron ser la razón de mis razones.

Los resultados presentados en esta Tesis fueron parcialmente publicados en:

Revistas

– Regulation of the neuronal norepinephrine transporter by endothelin-1 and -3 in the rat anterior and posterior hypothalamus. Hope SI, Schmipp J, Rossi AH, Bianciotti LG, Vatta MS. *Neurochemistry International* 53(6-8): 207-213, 2008

– Endothelin-1 and -3 modulate the neuronal norepinephrine transporter through multiple signalling pathways in the rat posterior hypothalamus. Hope SI, Nabhen SL, Soria C, Bianciotti LG, Vatta MS. *Neurochemistry International* 57(3): 306-313. 2010.

Capítulos de Libros

– Endothelins: A family of peptides with multiple biological functions. Vatta MS, Bianciotti LG, Perfume G, Nabhen SL, Hope SI, Riquelme Barrera K. In: Rodriguez de Lores Arnaiz G (Ed.) *Functions of neuropeptides at central nervous system*. Research Signpost, Chapter 6, pp. 149-169, 2009.

– Regulation of the norepinephrine transporter by endothelins: A potential therapeutic target. Vatta MS, Bianciotti LG, Guil MJ, Hope SI. In: Litwack G. (Ed.) *Vitamins & Hormones (Hormones and Transport Systems)*. Burlington: Academic Press. Vol. 98, Chapter 12, pp 371-405, 2015.

Índice

Abreviaturas usadas en el texto	7
1- Introducción	9
1.1- Catecolaminas	9
1.1.1- Biosíntesis	10
1.1.2- Almacenamiento de Noradrenalina	12
1.1.3- Liberación de Noradrenalina	13
1.1.4- Interacción de Noradrenalina con sus receptores	15
1.1.5- Inactivación biológica de Noradrenalina	17
✓ Captación de Noradrenalina	19
✓ Transportador Neuronal de Noradrenalina	19
✓ Estructura del NET	23
✓ Expresión e internalización del NET en la membrana	25
✓ Regulación del NET	29
✓ NET y su participación en diversas patologías	34
1.2- Hipotálamo	36
1.2.1- Hipotálamo anterior	37
1.2.2- Hipotálamo medio	39
1.2.3- Hipotálamo posterior	40
1.3- Endotelinas	43
1.3.1- Biosíntesis	46
1.3.2- Genes y su regulación	48
1.3.3- Estructura y receptores	49
1.3.4- Mecanismos intracelulares	54
1.3.5- Acciones Biológicas	59
- Acciones de las ETs sobre el sistema nervioso	59
- Acciones de las ETs sobre el sistema cardiovascular	62
- Acciones de las ETs sobre el sistema renal	63
Otros efectos biológicos de las ETs	64
2- Hipótesis y objetivos	67
3- Materiales y métodos	70
3.1- Animales.	70
3.2- Drogas y reactivos.	70
3.3- Protocolos experimentales.	71
3.3.1- Estudio de la actividad del NET	71
3.3.2- Estudio del mecanismo de internalización del NET	75
3.4- Análisis estadístico	76

4-Resultados	77
4.1- Estudio de la actividad del NET	77
4.1.1- Determinación de los efectos de ET-1 y -3 sobre la captación de NA	77
-Efectos de distintas concentraciones de ET-1 y -3 sobre la captación de la NA	77
-Definición de los efectos de las ETs sobre la captación neuronal y/o extraneuronal de la Noradrenalina	80
-Determinación de la curva de captación de NA a diferentes tiempos	84
4.1.2- Determinación de los efectos de las ETs sobre la cinética del NET	86
4.1.3- Determinación de los receptores involucrados	90
4.1.4- Determinación de los mecanismos intracelulares involucrados	95
- Participación de la proteína G	95
- Participación de la vía del óxido nítrico	98
- Participación de la vía de los fosfoinosítidos	107
- Participación de la vía del AMPc/PKA	112
- Participación del calcio	116
4.2- Estudio del mecanismo de internalización del NET	121
4.2.1- Estudio de los efectos de las ETs sobre la unión de Nisoxetina	121
4.2.2- Determinación de los mecanismos intracelulares involucrados.	124
5-Discusión	130
6- Conclusiones	156
Referencias bibliográficas	160

Abreviaturas usadas en el texto

5- HT: Serotonina

ADN: ácido desoxirribonucleico

Ad: adrenalina

AMPc: adenosín monofosfato cíclico.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

AVPV: núcleo anteroventral periventricular

BH₄: tetrahidrobiopterina

BHE: Barrera hematoencefálica

BO: bulbo olfatorio

CA: catecolamina

CaMK II: quinasa dependiente de Ca²⁺ - Calmodulina

COMT: catecol O metil transferasa

DA: dopamina

DAG: diacilglicerol

DMI: desipramina

ECE: enzima convertidora de endotelinas

EDTA: ácido etilendiaminotetra-acético

EGTA: ácido etilen glicol tetra-acético

ET: endotelina

ET_A: receptor de ET tipo A

ET_B: receptor de ET tipo B

FSH: hormona folículo estimulante

GABA: ácido γ-aminobutírico

GMPC: guanosil monofosfato cíclico

HA: hipotálamo anterior

HP: hipotálamo posterior

HUGO: Human Genome Organisation

[³H]-NA: noradrenalina tritiada

[³H]-NSX: nisoxetina tritiada

ICV: intracerebroventricular

IP₃: inositol-3-fosfato

LCR: líquido cefalorraquídeo

MAO: monoaminooxidasa

NA: noradrenalina
NET: transportador neuronal de NA
NO: óxido nítrico
NOS: óxido nítrico sintasa
NOSn: óxido nítrico sintasa neuronal
NSF: factor sensible a la N-etilmaleimida
NSX: Nisoxetina
OSC: órgano subcomisural
OSF: órgano subfornical
OVL: órgano vascular de la lámina terminal
PA: presión arterial
PKA: proteína quinasa A
PKC: proteína quinasa C
PKG: proteína quinasa G
PLA₂: fosfolipasa A 2
PLC: fosfolipasa C
PLD: fosfolipasa D
PNMT: Fenil etanol amina N-metil transferasa
q-BH₂: quinona-dihidrobiopterina
TDH: déficit de atención con hiperactividad
TDM: trastorno depresivo mayor
SERT: Transportador de serotonina
SLC: solute carrier
SNAPs: proteínas NSF solubles de amarre
SNARE: proteína soluble integral de membrana N-etilmaleimida de unión al receptor
SNC: sistema nervioso central
SON: núcleo supraóptico
SYN A₁ y SYN B₁: Sintaxinas A₁ y B₁
TH: tirosina hidroxilasa
TM: dominios transmembrana α -helicoidales
t-SNARE: target- SNARE de la membrana plasmática
v- SNARE: SNARE de las vesícula

1- Introducción

El sistema nervioso (SN) de los mamíferos contiene un gran número de neuronas que se comunican entre sí a través de mensajeros químicos llamados neurotransmisores. En la actualidad se conocen más de 100 agentes diferentes que actúan como neurotransmisores, aunque aún quedan más por descubrirse. Dentro de estas sustancias existen dos grandes categorías de transmisores: Los neuropéptidos, que constituyen un grupo en constante crecimiento, constituido por moléculas relativamente grandes, y los neurotransmisores de molécula pequeña formado por los aminoácidos (GABA, glutamato y glicina) la acetilcolina, serotonina (5-HT) e histamina. A estas moléculas se suma una familia de neurotransmisores de molécula pequeña denominada catecolaminas (CAs), la cual está integrada por la dopamina (DA), noradrenalina (NA) y adrenalina (Ad) (Torres y Amara, 2007; Immadisetty y Madura 2013).

En el nuestro caso particular, y debido al tema de la tesis vamos a desarrollar con detenimiento el análisis de las CAs poniendo mayor foco en la NA.

1.1- Catecolaminas

Las CAs son neurotransmisores que poseen en su estructura química un núcleo catecol, y derivan de un precursor común, el aminoácido L-tirosina. Estos neurotransmisores en su conjunto se encuentran distribuidos en diversas regiones y áreas del sistema nervioso central y en el caso de la NA está también en las neuronas noradrenérgicas post-ganglionares simpáticas (Mandela y Ordway, 2006; Torres y Amara., 2007, Immadisetty y Madura 2013).

La fisiología de cualquier neurotransmisor es compleja y cíclica, por ésta razón y para un estudio sistemático se lo divide, en general, en los siguientes pasos:

- 1-Biosíntesis
- 2-Almacenamiento
- 3-Liberación
- 4-Interacción con los receptores específicos
- 5-Inactivación biológica y degradación.

En lo que respecta a las CAs, tanto sus niveles como sus funciones biológicas están reguladas en los distintos pasos de la neurotransmisión, incluyendo la liberación de las mismas desde las neuronas o de las células cromafines de la médula adrenal, el tipo y sensibilidad de los múltiples receptores, la eficacia del sistema de recaptación y la velocidad de síntesis y degradación de las mismas. A continuación analizaremos cada uno de éstos pasos.

1.1.1- Biosíntesis de Noradrenalina

Las CAs se sintetizan a partir del aminoácido aromático, la L-tirosina que proviene de la dieta (*Fig 2*). También puede provenir de la fenilalanina la que se transforma en tirosina por acción de una hidroxilasa hepática. Por acción de la tirosina hidroxilasa, la L- tirosina es convertida en 3,4-dihidroxifenilalanina o L-dopa. Esta reacción constituye el paso limitante en la síntesis de CAs y requiere de Fe^{2+} en el sitio activo, O_2 y tetrahidrobiopterina como cofactores (*Fig. 1*) (Fitzpatrick 2003; Roberts y Fitzpatrick 2013; Tekin y col., 2014).

La L- dopa se transforma en DA mediante la acción de la enzima decarboxilasa de aminoácidos L-aromáticos (*Fig 1*). Este paso se produce a nivel citoplasmático de las terminaciones pre sinápticas e inmediatamente la DA entra en las vesículas sinápticas por un transportador vesicular de monoaminas también conocido como VMAT.

Dentro de la vesícula en la porción interna de la membrana se encuentra la dopamina β - hidroxilasa que en presencia de ácido ascórbico y O_2 convierte la DA en NA, mediante la hidroxilación a nivel del carbono β de la cadena lateral. Luego la NA es finalmente metilada por la feniletanolamina N-metiltransferasa en el grupo amino para formar Ad (*Phillippu y Matthaei, 1988; Flatmark y col., 2000; Eisenhofer y col., 2004*). (*Fig 1*).

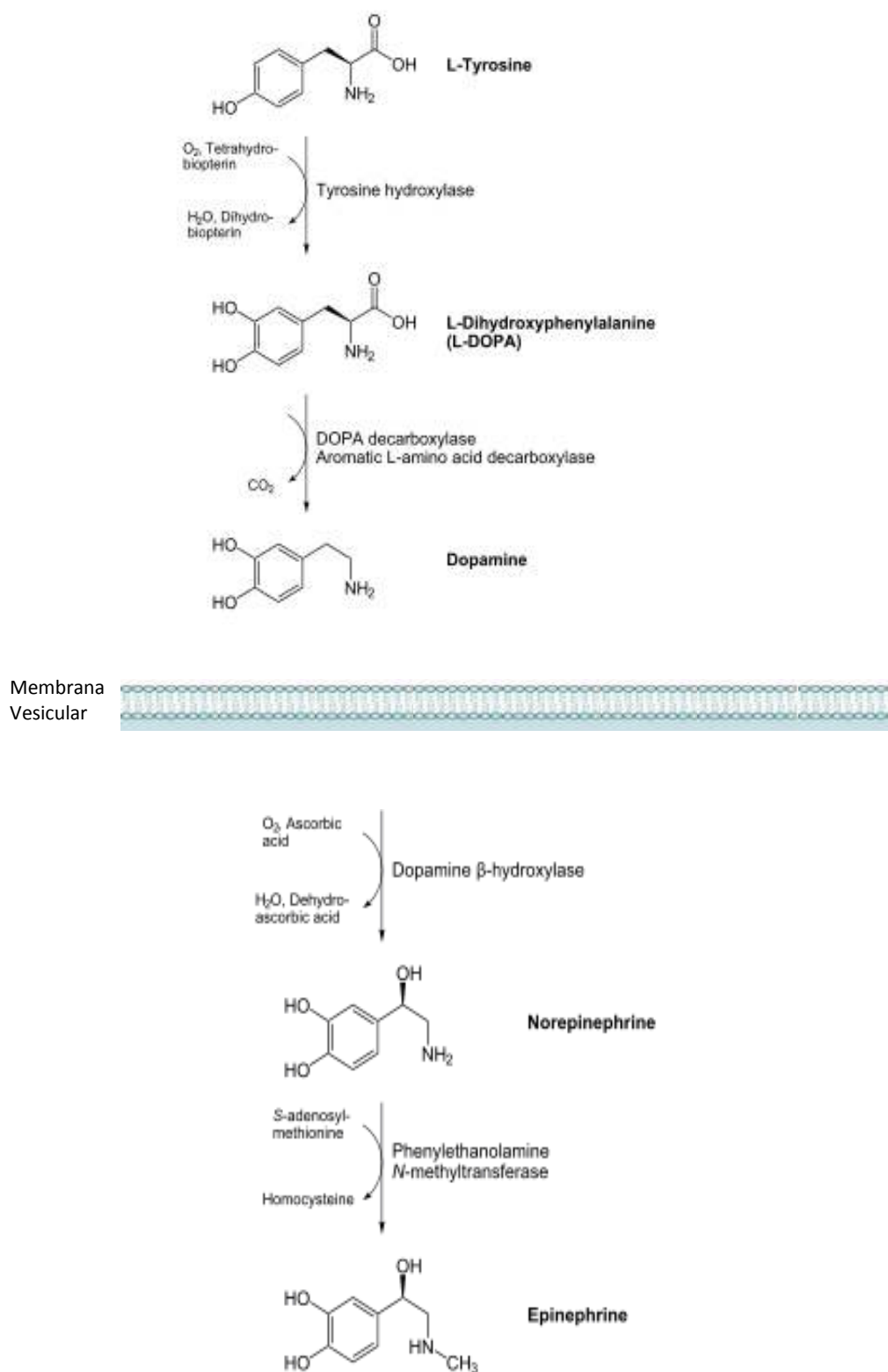


Figura 1: Esquema simplificado de la biosíntesis de catecolaminas (Modificado de Tekin y col., 2014).

1.1.2- Almacenamiento de Noradrenalina

La importancia fisiológica del almacenamiento de CA reside en que (*Phillippu y Matthaei; 1988*):

- ✓ Sirve de reserva de cantidades importantes de CAs.
- ✓ Interviene en los últimos pasos de la síntesis de NA y Ad.
- ✓ Protege a las CAs almacenadas de la actividad degradativa de la enzima, monoamino- oxidasa (MAO).
- ✓ Integra las etapas previa y final que antecede al mecanismo exocitótico del neurotransmisor.

El compartimiento vesicular de las terminales nerviosas noradrenérgicas es el recinto donde se produce el almacenamiento de la NA sintetizada o recaptada. Dichas vesículas sinápticas no solo contienen CAs sino también nucleósidos, ácido ascórbico, Ca^{2+} , cromograninas (A,B,C), enzimas y péptidos neuromoduladores (encefalinas, neuropéptido Y, neurotensina, etc) (*Phillippu y Matthaei, 1988; Eisenhofer y col., 2004; Blakely, 2005*). En la membrana vesicular existe un transportador de CAs que capta las aminas hacia el interior de la vesícula, que depende de la actividad de una ATPasa- Mg^{2+} , la que actúa como una bomba electrogénica translocadora de protones, generando un gradiente protónico y de voltaje que son determinantes para el transporte de aminas a través de la membrana vesicular (*Blakely, 2005; Liu y Chen, 2008, Blakely y Edwards, 2012*).

Dentro de las vesículas presinápticas existen dos fracciones de almacenamiento, una que pertenece a las vesículas de liberación rápida a las que se denomina funcional y pertenecen a un pool de reciente síntesis cuya vida media es de dos horas, y la otra fracción corresponde a un pool de reserva de liberación lenta y cuya vida media es de 24 horas aproximadamente (*Blakely, 2005, Blakely y Edwards, 2012*)

Finalmente, al completar su ciclo funcional, los gránulos se degradan por acción de los lisosomas, pudiendo algunas de ellas retornar hacia el soma acopladas al flujo axonal retrógrado (*Zahniser y Doolen, 2001; Bönisch y Brüss, 2006; Reith y col, 2006*)

1.1.3- Liberación de Noradrenalina

La liberación es un proceso transitorio en el que se produce la exocitosis de las CAs desde las vesículas, donde se almacenan, hacia el espacio sináptico.

Su inicio se produce cuando una señal despolarizante de excitación-secreción, moviliza sodio (Na^+) y potasio (K^+), además de un aumento de la concentración de calcio (Ca^{2+}) intracelular, factor fundamental para éste proceso. Dicho incremento del influjo de Ca^{2+} a través de canales voltaje dependientes, favorece el mecanismo exocitótico que además de ser Ca^{2+} dependiente es energía dependiente. Previamente debe existir movilización, adosamiento y fusión de la membrana vesicular a la membrana presináptica. La exocitosis de NA se realiza junto con la co-liberación de múltiples y heterogéneos componentes solubles intravesiculares (*Eisenhofer y col., 2004*). El acoplamiento de las vesículas a la membrana presináptica se produce por la interacción entre proteínas ancladas en los sitios activos de la membrana (lugar de la membrana plasmática donde ocurre la liberación del neurotransmisor) y a la superficie de las vesículas. Dentro de estas proteínas se encuentran las: SNAREs (como receptores del NSF (factor sensible a la N-etilmaleimida) y las SNAPs (proteínas NSF solubles de amarre), (*Trifaró y col., 1999, Chaineau y col., 2009; Prescott y col., 2009*) y Sinaptotagmina (proteína sináptica que actúa como sensor de Ca^{2+}). La complexina, es una proteína que se une al complejo SNARE y regula las funciones del mismo en competencia con la α -SNAP (*Sollner y col., 1993; Burkhardt y col., 2008, 2011; Colbert y col., 2013*). La sinapsina, otra proteína que se encuentra en la membrana de las vesículas y que interactúa con la SNAP-25 modulando las interacciones entre las SNAREs y la sinaptotagmina (*Ilardi y col., 1999, Burkhardt y col., 2008, 2011; Colbert y col., 2013; Blakely y Edwards, 2012, Südhof, 2013*). En la membrana plasmática se encuentra, también, la sinaptofilina que compite con la SNAP-25 por la unión con la syntaxina e inhibe la formación del complejo SNARE mediante su unión con la misma en los terminales nerviosos. La formación del complejo SNARE también está regulada por proteínas que interactúan con la syntaxina, como la Munc-18, la tomosina, entre otras (*Pevsner y col., 1994; Fujita y col., 1998, Burkhardt y col., 2008, 2011; Colbert y col., 2013*)

Diversas proteínas kinasas como la CAM kinasa II, PKC, PKA y PKG se expresan en los terminales nerviosos presinápticos. Estas kinasas regulan a corto plazo la liberación de neurotransmisores en diversos tejidos neuronales y células endocrinas (*Sakurai y col., 1995;*

Hirling y Scheller, 1996; Shimazaki y col., 1996, Majewski y Iannazzo, 2008, Südhof, 2013) Tanto los canales de calcio presinápticos como las proteínas SNARE son fosforilados por una o más kinasas (Zahniser y Doolen, 2001; Reith y col, 2006). Se observó que la PKC fosforila a la Munc-18 llevando a un aumento de los niveles de interacción entre la sinaptobrevina y la syntaxina y de la respuesta secretora (Südhof, 2013). Además, luego de la fosforilación con PKA, la unión de α -SNAP y el complejo SNARE es diez veces más débil que de la forma desfosforilada (Südhof, 2013).

La sinaptotagmina se encuentra asociada a la membrana vesicular y se localizó tanto en terminales nerviosas centrales como periféricas (Blakely y Edwards, 2012). Es específica de tejidos neuronales y neuroendocrinos (Colbert y col., 2013). Hace ya algunos años que se cree que actúa como sensor de Ca^{2+} en la exocitosis (Bönisch y Brüss, 2006). Diversos estudios demostraron que esta proteína se une a los canales de calcio tipo N, P/Q y L (Bönisch y Brüss, 2006). Esta proteína también se une a la syntaxina en la misma región donde se encuentra la porción de syntaxina que se une al complejo SNARE (Schroeter y col. 2000;). Estas interacciones son dependientes (Gerona y col., 2000) e independientes de calcio (Schiavo y col., 1997; Sutton y col., 1999). Se demostró que el calcio dispara la penetración de la sinaptotagmina en las membranas presinápticas y simultáneamente aumenta la unión de las mismas con el complejo SNARE, apoyando el modelo molecular en el cual la sinaptotagmina dispara la exocitosis vía su interacción con las membranas y el complejo SNARE (Schroeter y col. 2000). Ante la entrada de Ca^{2+} , la sinaptotagmina actuaría como un switch electroestático promoviendo la reorganización de la maquinaria de fusión (Hahn y Blakely, 2007).

Por otra parte, la liberación está limitada temporalmente por distintos y variados mecanismos que intervienen reduciendo gradualmente la concentración de calcio libre en el citoplasma (Colbert y col., 2013).

Este proceso posee una gran trascendencia en la fisiología de la neurotransmisión, por ello se usa como blanco de acción de diversos neuropéptidos moduladores. Un ejemplo de la modulación por péptidos es lo documentado en trabajos previos de nuestro laboratorio en donde demostramos que tanto la angiotensina III como los factores natriuréticos (ANF, BNP y CNP) modulan la liberación de NA en el hipotálamo de rata normotensa (Vatta y col., 1992; 1996; 1999; Papouchado y col., 1995; Rodríguez-Campos y col, 2000). Así se determinó que la angiotensina III incrementa la liberación de NA mediante la activación de la vía de la PLC/IP₃-PLC/DAG-PKC (Papouchado y col., 1995; Rodríguez-Campos y col., 2000) y que el ANF la

disminuye a través de la vía GMPc-PKG (Vatta y col., 1999). Por su parte, las ETs regulan diferencialmente la liberación neuronal de NA en HA y HP de ratas normotensas. De esta manera se observó que en el HA las ETs disminuyen la liberación neuronal de NA a través de la activación del receptor ET_B y la vía del óxido nítrico/ GCs / CMPC / PKG / receptor GABA_A (di Nunzio y col., 2002; Jaureguiberry y col., 2004). Por su parte en el HP tanto la ET-1 como la ET-3 incrementa la liberación neuronal de la NA mediante la unión a receptores atípicos y desencadena mecanismos intracelulares complejos que involucran un “cross-talk” entre PLC y PKC y la vía del AMPc y PKA (di Nunzio y col., 2004).

1.1.4- Interacción de la Noradrenalina con sus receptores

Al liberarse al espacio sináptico, la NA interactúa con los receptores ubicados en las células efectoras y/o terminales presinápticos. Por ésta interacción se activan diversos procesos que culminan con la respuesta biológica correspondiente.

La activación de los adrenoreceptores constituye el paso inicial de una serie de mecanismos moleculares que determinan la aparición de la respuesta biológica (Tabla 1). Los adrenoreceptores pertenecen a la superfamilia de receptores que están acoplados a proteína G (Sun y col., 2002; Hein y col., 2004; Siegel, 2006). Son glicoproteínas integrales de membrana que presentan 7 dominios hidrofóbicos transmembrana o α -hélices unidos entre sí por puentes o cadenas hidrofílicas (Siegel, 2006).

Se puede clasificar los receptores adrenérgicos en tres tipos denominados α_1 , α_2 y β (Siegel, 2006). Los distintos tipos celulares pueden poseer todos o sólo uno de ellos con un mecanismo de acción característico como se detalla en la Tabla 1.

Fisiológicamente, los receptores α_1 median importantes respuestas, especialmente a las involucradas en la homeostasis cardiovascular como la constricción del músculo liso arteriolar (Xiaohong y col., 2000; Vecchione y col., 2002) y los receptores α_2 median múltiples funciones tanto en órganos periféricos como en el SNC. A nivel periférico se destaca la inhibición presináptica de la liberación nerviosa de NA (Gobert y col., 2004; Torok y col., 2004; Li y col., 2005), y de otros transmisores (acetilcolina, 5-HT, etc.) (Scheibner y col., 2001; Ansah y col., 2003). Respecto a la acción sobre la presión arterial, la activación de los receptores α_2 activa las áreas que participan en la regulación de la misma en el hipotálamo y se acompaña de hipotensión arterial y bradicardia. Este efecto es resultado de una disminución de la

descarga simpática y un aumento de la actividad parasimpática (Vayssettes-Courchay y col., 2002; Peng y col., 2003; Li y col., 2005).

Por otra parte, los receptores β_1 median el aumento de la actividad inotrópica y cronotrópica cardíaca, la estimulación de la secreción de renina (Henrich y col., 1983), la relajación de las arterias coronarias (Sun y col., 2002; Hein y col., 2004), etc. Mientras que los receptores β_2 inducen la relajación de la musculatura lisa bronquial (Fullerton y col., 1996; Priest y col., 1997), vascular (Ferro y col., 2004); y a nivel presináptico facilitan la liberación de NA de las terminaciones nerviosas simpáticas (Aker y Cassis, 2000;). Por su parte, los receptores β_3 promueven la lipólisis en el tejido adiposo liso (Carrington y col., 2003), y la termogénesis en el tejido adiposo pardo (Liu y col., 2008); la secreción de insulina en el páncreas (Moreno-Aliaga y col., 2002); entre otras acciones.

Tabla I. Propiedades, distribución y mecanismos de acción de los adrenoreceptores. (Siegel, 2006)

	$\alpha 1A$	$\alpha 1B$	$\alpha 1C$
Aminoácidos	466	515	561
Acoplados	Gq/11/14	Gq/11/14/16 Gh	Gq/11
Fosforilación	PKA	PKA	desconocido
Agonistas no selectivos	Fenilefrina metoxamina	fenilefrina metoxamina	fenilefrina a metoxamina
Antagonista selectivo	5-Metil- uradipilo	AH1110H	BMY7378
Localización	Corazón, próstata, pulmón, hígado, SNC	Bazo, pulmón, riñón, aorta, SNC	Aorta, próstata, SNC

	$\alpha 2$
Aminoácidos	450
Acoplados	Gi/Gs
Fosforilación	PKA
Agonistas no selectivos	clonidina
Antagonista selectivo	yohibina
Localización	Pulmón, aparato digestivo, SNC

Tabla I. Continuación)

	$\beta 1$	$\beta 2$	$\beta 3$
Aminoácidos	477	413	408
Acoplados	Gs	Gs	Gs
Fosforilación	PKA	PKA	PKA
Agonista selectivo	Xamoterol	Procaterol	BRL37344
Antagonista selectivo	Atenolol	ICI 118,551	SR58894
Localización	Corazón	Musculo Liso y Bronquial	Tejido Adiposo

1.1.5- Inactivación biológica de la Noradrenalina

La inactivación de la NA es una serie de procesos secuenciales que comienzan con la recaptación del neurotransmisor el cual puede ser metabolizado por diferentes enzimas o captado nuevamente por la vesícula sináptica para estar en condiciones de ser liberado (Zahniser y Doolen, 2001; Bönisch y Brüss, 2006; Mandela y Ordway, 2006; Reith y col, 2006; Wersinger y col., 2006; Torres y Amara., 2007; Vatta y col., 2009). En consecuencia, tales procesos limitan temporalmente las acciones presinápticas y postsinápticas evocadas por el neurotransmisor liberado. La inactivación de las CAs puede ocurrir tanto en neuronas como en tipos celulares como la glía.

Como se comento previamente, el proceso de inactivación biológica de la NA involucra diversos mecanismos tales como (Hanh y Blakely, 2007):

✓ **Difusión en el espacio extracelular:** Una vez liberado, el neurotransmisor simpático difunde en el espacio sináptico y se diluye progresivamente. Esto adquiere importancia en el sistema nervioso periférico.

✓ **Captación extraneuronal o captación 2:** Este mecanismo tiene lugar en las células no neuronales (músculo liso, cardíaco, glía, etc). Este sistema de inactivación reviste menor importancia fisiológica que la captación neuronal, además, es de baja afinidad, carece de estereoespecificidad, no es inhibido por la cocaína o antidepresivos tricíclicos y no desaparece por denervación de las estructuras periféricas. Se satura en concentraciones mucho más altas de sustrato (posee mayor capacidad). La proteína responsable del uptake-2 es el

transportador extraneuronal monoaminas (EMT) en los seres humanos y el transportador de cationes orgánicos 3 (OCT3) en ratas (Zwarts y col, 2001, Ibersen, 2006). El proceso de captación extraneuronal se bloquea por compuestos O-metilados del catecol y por derivados esteroides (cortisol, cortisona, hidrocortisona) (Mandela y Ordway, 2006; Reith y col, 2006; Torres y Amara., 2007). El proceso de captación extraneuronal se acopla a la metabolización por catecol O metil transferasa (COMT), operando también en forma de un proceso secuencial.

✓ **Captación neuronal o captación 1:** Es la principal forma de inactivación de la NA, se realiza a través de un transportador neuronal de NA (NET) y es el proceso en el que vamos a centrar la presente investigación, el cual vamos a desarrollar en detalle más adelante.

✓ **Inactivación enzimática:** Este proceso es llevado a cabo por dos reacciones enzimáticas, una desaminación oxidativa realizada por la enzima monoamino oxidasa (MAO) y una metilación producida por la COMT (Youdim y Reiderer, 1988).

El papel fisiológico de la MAO consiste en controlar la cantidad de CAs libres en las terminaciones nerviosas (Youdim y Reiderer, 1988). La enzima MAO está localizada principalmente en las mitocondrias de las terminaciones nerviosas. En humanos existen dos isoenzimas: MAO-A y MAO-B. Ambas se encuentran tanto en neuronas como en la glía. La MAO-A también se encuentra en el hígado, tracto gastrointestinal y la placenta y desdobla selectivamente la 5-HT y la NA. La MAO-B se encuentra mayormente en la sangre y las plaquetas y los substratos preferidos son la feniletilamina y la bencilamina.

Ambas tienen inhibidores que producen disminución o bloqueo total de su actividad enzimática, éstos fueron los primeros fármacos usados como antidepresivos e inhiben la desaminación oxidativa de las monoaminas. Los primeros utilizados (fenelzina, nialamida y posteriormente tranilcipromina) son inhibidores irreversibles de ambos tipos de MAO, siendo éste su principal inconveniente, ya que la reactivación de la actividad enzimática depende de nueva síntesis de la misma. Los inhibidores reversibles de la MAO sólo lo hacen por unas horas, menos de 24, por lo que su uso es más seguro.

Por otra parte, los inhibidores de la MAO-B, como el deprenil, a las dosis que son necesarias en terapéutica, dejan de ser selectivos y afectan preferentemente el metabolismo de la DA, por lo que son de utilidad en la enfermedad de Parkinson. Otros inhibidores son Pargilina, Iproniazida y Hidralazina, utilizados en el tratamiento de la depresión (Kopin, 1972; Youdim y Reiderer, 1988). Estos fármacos se usan para el tratamiento de la depresión.

La COMT se encuentra en casi todas las células, entre las que se incluyen a los eritrocitos. Esta enzima actúa sobre las CAs extraneuronales. La enzima, que requiere Mg^{2+} , transfiere un grupo metilo desde el cosustrato S-adenosilmetionina al grupo 3-hidroxilo en el anillo de la CA.

– Captación neuronal de Noradrenalina o captación 1:

Como se comentó anteriormente, este mecanismo es la principal forma de inactivación de la NA (Torres y Amara, 2007; Zahniser y Doolen, 2001; Bönsch y Brüss, 2006, Wersinger y col., 2006; Mandela y Ordway, 2006).

Este concepto, data de sólo 40 años y se debe a Julius Axelrod (1964), quien afirmó que el proceso de captación es un importante mecanismo de inactivación de los neurotransmisores. Antes de esto, se asumía que el mismo, era realizado sólo por una inactivación enzimática rápida luego de la liberación del neurotransmisor en la terminal neuronal, como ocurre con la acetilcolina que es inactivada por la acetilcolinesterasa.

La captación neuronal de NA es un proceso activo en el que participa un transportador ATPasa Na^+/K^+ dependiente, denominado NET.

✓ Transportador neuronal de Noradrenalina (NET)

A éste transportador se lo encuentra en la membrana plasmática de neuronas noradrenérgicas y no sólo regula la vida media de la NA en la sinápsis sino también desempeña un papel muy importante en la homeostasis del neurotransmisor entre las terminales presinápticas y postsinápticas (Xu y col., 2000; Zahniser y Doolen, 2001, Xu y col., 2007, Blakely y Edwards, 2012).

El NET, presenta alta afinidad por la NA, cinética de saturación característica y es sensible tanto a la temperatura como a la reducción de la concentración de Na^+ extracelular y a la energía (ATP) (Hahn y Blakely, 2007). La DA, las aminas simpaticomiméticas y las anfetaminas son otros sustratos a los que es afín, pero en menor proporción. La captación neuronal es inhibida por cocaína y antidepresivos tricíclicos.

El Comité de Nomenclaturas del Human Genome Organisation (HUGO) reglamentó la nomenclatura para nombrar los distintos transportadores según los genes que codifican

estructura y función (<http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature>). (He y col., 2009, Kristensen y col., 2011).

Según ésta nomenclatura los genes se nombran usando el símbolo de raíz SLC (solute carrier), seguido por un número (ej., SLC1, la familia del transportador del soluto 1), luego una letra A, B, C... la que actúan como divisor entre los números y sirve para diferenciar subfamilias y finalmente el número individual para del transportador (ej., SLC3A1). En la actualidad los SLC posees 55 familias constituidas por superfamilias con un total de al menos 362 genes codificadores de proteínas funcionales putativas (He y col., 2009, Kristensen y col., 2011, Rudnick y col., 2014).

Dentro de la superfamilias de los transportadores SLC6 existen familias en las que podemos incluir (Lei y col., 2009, Kristensen y col., 2011, Blakely y Edwards, 2012; Rudnick y col., 2014):

- Transportadores de membrana vesicular
- Transportadores de membrana plasmática: a éste grupo pertenece el NET

Los SLC6 se agrupan en cuatro subfamilias o ramas (Fig 2):

- ✓ la rama del transportador de GABA, (SLC6A: 1, 6, 8,11, 12,13)
- ✓ la rama del transportador del aminoácido y (SLC6A: 5, 7, 9, 14)
- ✓ la rama de transportadores huérfano que transportan aminoácidos (SLC6A: 15, 16, 17, 18, 19, 20).
- ✓ la rama del transportador de la monoaminas, al cual pertenece el NET (SLC6A: 2, 3, 4).

Estas familias de transportadores presentan similitud en las secuencias de aminoácido y los mecanismos que suministran la energía para el transporte.

De acuerdo a los iones involucrados en el suministro de energía se puede clasificar en superfamilias:

✓ **Superfamilias de transportadores Na⁺/ K⁺ dependiente:** en ésta se incluyen los transportadores de glutamina, alanina, serina, cisteína.

✓ **Superfamilias de transportadores Na^+/Cl^- dependiente:** en éste grupos de encuentran los transportadores de GABA, SERT, DAT, betaína, prolina, glicina, taurina y el NET.

Por lo tanto, y de acuerdo a la nomenclatura antes citada, el **NET** pertenece a la familia: SLC6A2, y dentro de la misma está incluida en la superfamilia de transportadores de Na^+/Cl^- dependiente.

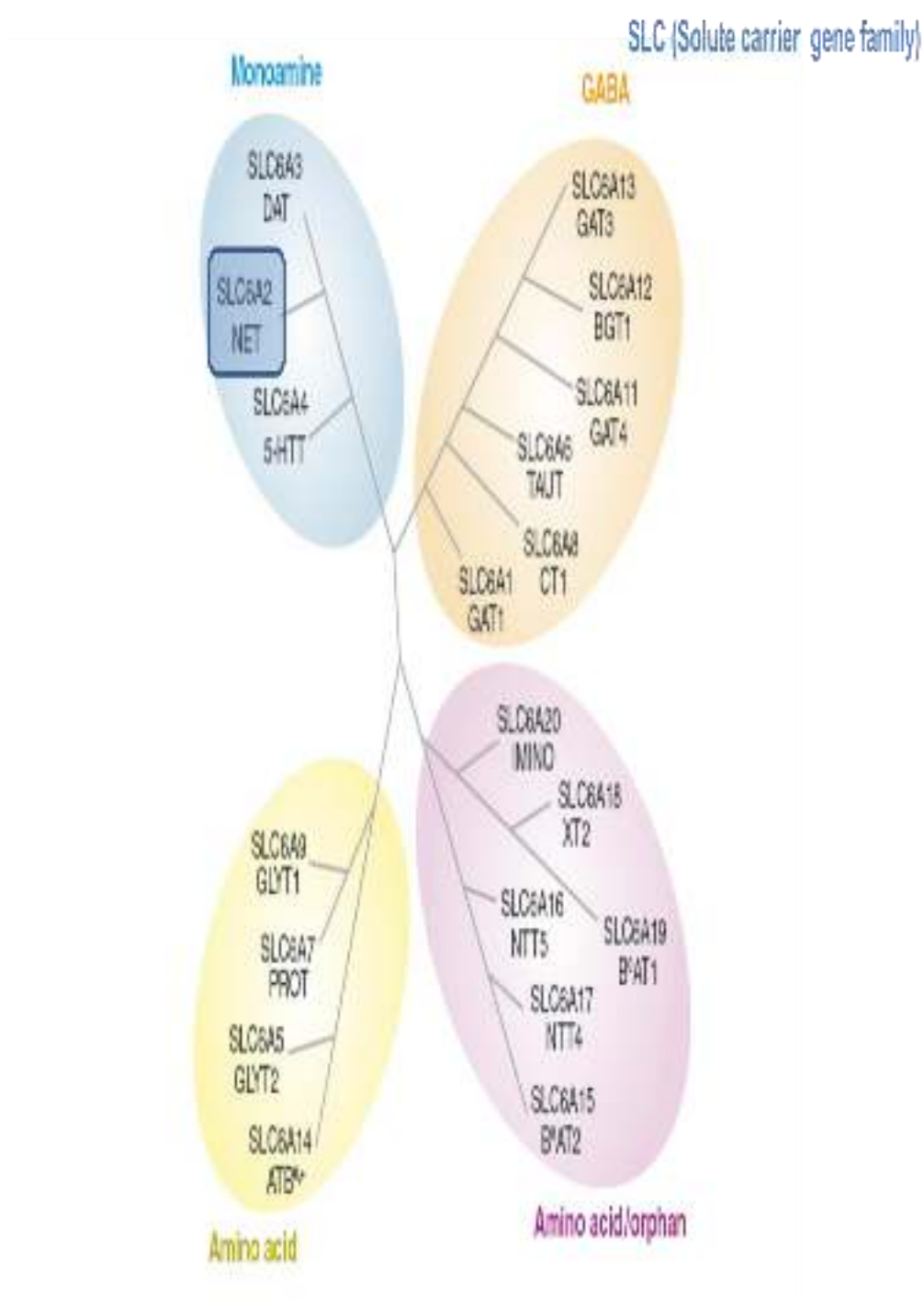


Figura 2: Esquema o árbol de familias de transportadores de soluto SLC6 e integrantes de la familia. (Hanh y Blakely, 2008)

✓ Estructura del NET:

A través del análisis de la estructura del transportador se tiene información detallada respecto a los residuos y dominios funcionales, su regulación, su unión con el sustrato y los sitios de interacción con las diferentes drogas (*Ibersen, 2006 Torres y Amara, 2007, Kristensen y col., 2011, Manepalli y col., 2012*).

En su estructura existen 12 dominios hidrófobos de 15 a 25 aminoácidos, formando dominios transmembrana α -helicoidales (TM), con dos terminales intracelulares, uno amino terminal y otro carboxilo terminal (*Yamashita y col., 2005, Torres y Amara, 2007*). Los dominios TM se nombran del 1-12. Se observa que posee una estructura con simetría invertida cuyas repeticiones abarcan a TM1-TM5 y TM6-TM10 lo que se esquematizó en la *figura 3* (Fig.3 a) remarcadas con triángulos de color rosa y celeste (*Blakely, 2005, Mandela y Ordway, 2006, Ibersen, 2006; Hahn y Blakely, 2007, Torres y Amara, 2007, Manepalli y col., 2012*). Existen, también cinco loops intracelulares y seis extracelulares cortos (Fig.3 a y b) con excepción el segundo loop extracelular que es más grande y contiene 24 sitios de glicosilación. También se observa en la figura 3 que los sitios ocupados por el ión Na^+ (puntos azul marino) y el sustrato (triángulo marrón) están formados por segmentos no-helicoidales cerca del centro de TM1 y de TM6 (Fig.3 a y b). El sustrato y el ión Na^+ están en gran proximidad el uno con el otro, explicando el movimiento casi acoplado del catión y la NA. (*Yamashita y col., 2005, Hahn y Blakely, 2007, Torres y Amara, 2007, Manepalli y col., 2012*)

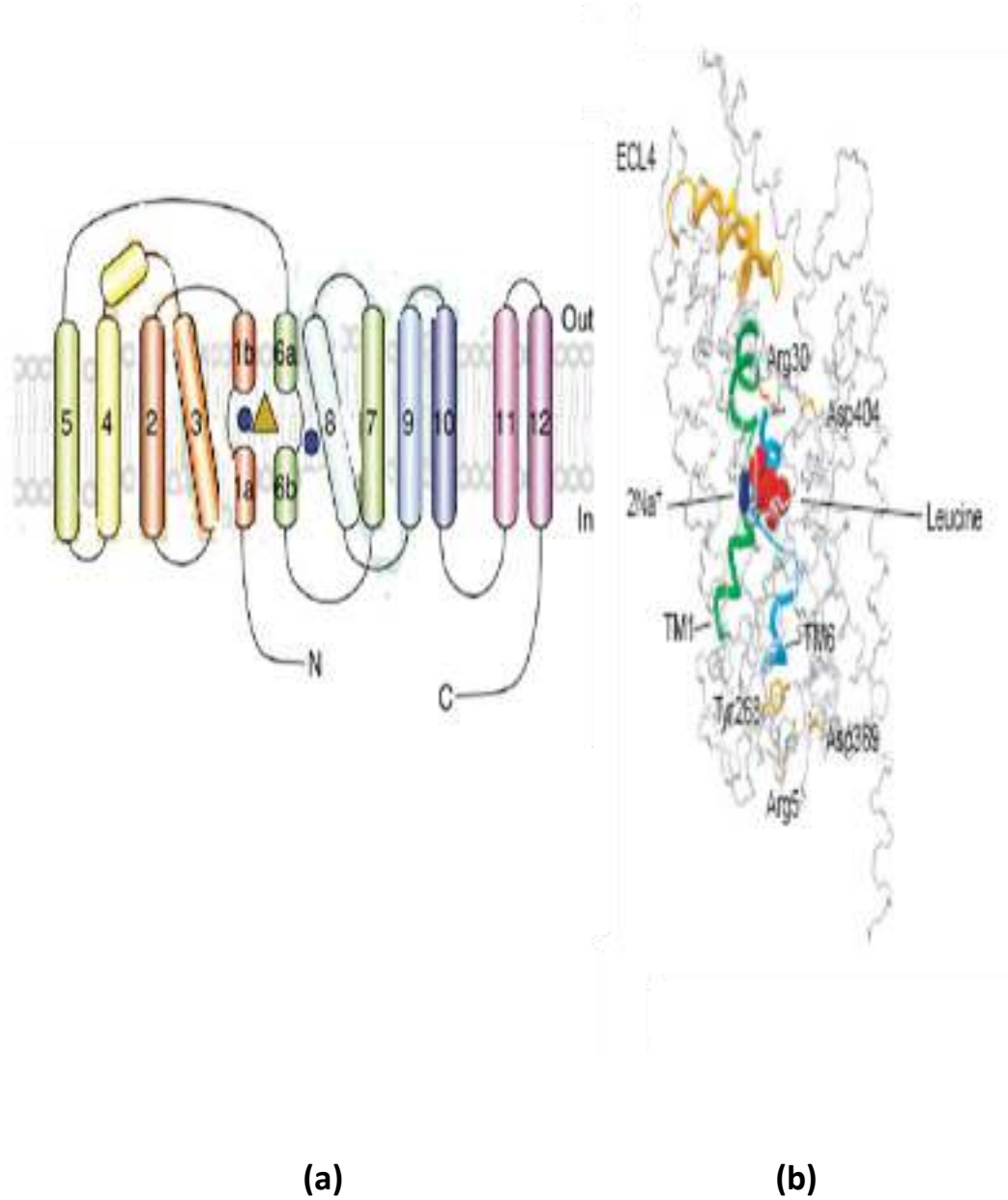


Figura 3: Esquema del NET. **(a)** Modelo bidimensional: modelo estructural topológico del NET (Torres y Amara, 2007) **(b)** Modelo tridimensional (Manepalli y col.,2012).

Como se comentó previamente, el NET pertenece a la familia de transportadores Na^+/Cl^- dependientes, esto se debe a que la energía electroquímica que necesita para introducir la NA deriva de una bomba que produce un gradiente Na^+ provocando la recaptación intracelular de neurotransmisor (Robinson, 2003), y su función es bloqueada selectivamente por la inhibición de la bomba dependiente de Na^+/Cl^- con drogas tales como cocaína, desipramina (DMI) y nisoxetina (NSX) (Apparsundaram., 2001, Robinson, 2003; Mandela y Ordway, 2006, Hahn y Blakely, 2007). Éstas drogas, por éstas características y su especificidad, se utilizan para identificar y caracterizar el NET, así como para determinar su distribución en los diferentes tejidos (Bauman y col., 2000; Blakely y Bauman 2000; Apparsundaram, 2001; Robinson, 2003). Los estudios cinéticos del transportador sugieren que la entrada del Na^+ con Cl^- son un requisito previo para que la NA se una al transportador (Apparsundaram, 2001; Bönisch y Brüss, 2006; Gouaux, 2009, Blakely y Edwards, 2012). El transporte de la NA por el NET es electrogénico con un aumento neto de la carga positiva, requiriendo también de un equilibrio crítico de los iones K^+ a través de la membrana celular (Bönisch y Brüss, 2006, Mandela y Ordway, 2006, Hahn y Blakely, 2007, Andersen y col., 2009; Gouaux, 2009, Manepalli y col., 2012).

✓ Expresión e internalización del NET en la membrana

El transportador de NA es el que regula la concentración de NA en el espacio sináptico y su actividad depende de la cantidad de transportadores expresados en la superficie de la membrana presináptica. Existe una dinámica de reciclaje del transportador entre la membrana plasmática y los compartimentos de los endosomas, a éste fenómeno se lo denominó internalización. La tasa de intercambio puede alcanzar entre 3 a 5% transportadores por minuto (Loder y Melikian 2003, Oaks y Sidhu., 2011). La abundancia del NET es proporcional al ritmo de requerimiento demandado por el proceso de liberación, variando así su expresión en la superficie de acuerdo su actividad intrínseca. De lo contrario, los estímulos que aumentan la liberación de NA generarían asincronía entre la liberación y recaptación (Quick, 2006; Oaks y Sidhu., 2011, Ramamoorthy y col., 2011).

Las responsables de la regulación, es decir de la internalización o de la expresión de los transportadores en la superficie de la célula son unas proteínas que interactúan con los respectivos transportadores y sus neurotransmisores como ocurre con SERT, glicina y GABA. Dichas proteínas se denominan SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment

protein receptor) y median la fusión de vesículas, el transportador y la membrana plasmática de la neurona. Se puede encontrar distintos tipos de SNARE como la v- SNARE (SNARE de las vesículas) que son las que se encuentran en las vesículas de transporte y como la t-SNARE (target- SNARE de la membrana plasmática) que se encuentran en las membranas de destino y dan especificidad al acoplamiento y fusión (Quick, 2006; Oaks y Sidhu, 2011, Ramamoorthy y col., 2011, Rudnick y col., 2014). Específicamente a éste grupo pertenecen tres proteínas sinápticas de membrana, la sinaptobrevina (o VAMP, proteína asociada a vesículas), y las proteínas asociadas a la membrana plasmática, syntaxina y SNAP-25 (proteína asociada a sinaptosomas de 25 Kda) (Ibersen, 2006; Jena, 2011, Rudnick y col., 2014). Las SNAREs se ensamblan formando un complejo ternario estable (1:1:1), el cual es disociado por el NSF en colaboración con la α -SNAP (Chen y Scheller, 2001; Jena, 2011, Ramamoorthy y col., 2011). Para que la fusión ocurra, el complejo debe formarse con una configuración *trans*. Una vez ocurrida la fusión con la consecuente liberación del neurotransmisor, el complejo SNARE pasa a una configuración *cis* (Chen y Scheller, 2001; Rizo y Südhof, 2002, Ramamoorthy y col., 2011).

El complejo SNARE interactúa con los canales de calcio tipo N y P/Q, los cuales proveen el calcio necesario para disparar la exocitosis en el SNC y periférico (Sheng y col., 1996; Rizo y Südhof, 2002; Jena, 2011). Sung y Blackely (2007) demostraron que la proteína involucrada en la regulación de la función del NET es específicamente la syntaxina (SYN A₁) (Fig 4). La interacción física entre la SYN A₁ y el NET provee el control en la capacidad de clearance para la modulación del transporte en la superficie y en paralelo impide directamente las señales para evitar la liberación de la NA o captación (Adam y col., 2011). Si se produce una disociación del complejo syntaxina / NET provocaría un retraso en el clearance del transmisor (Sung y col., 2002).

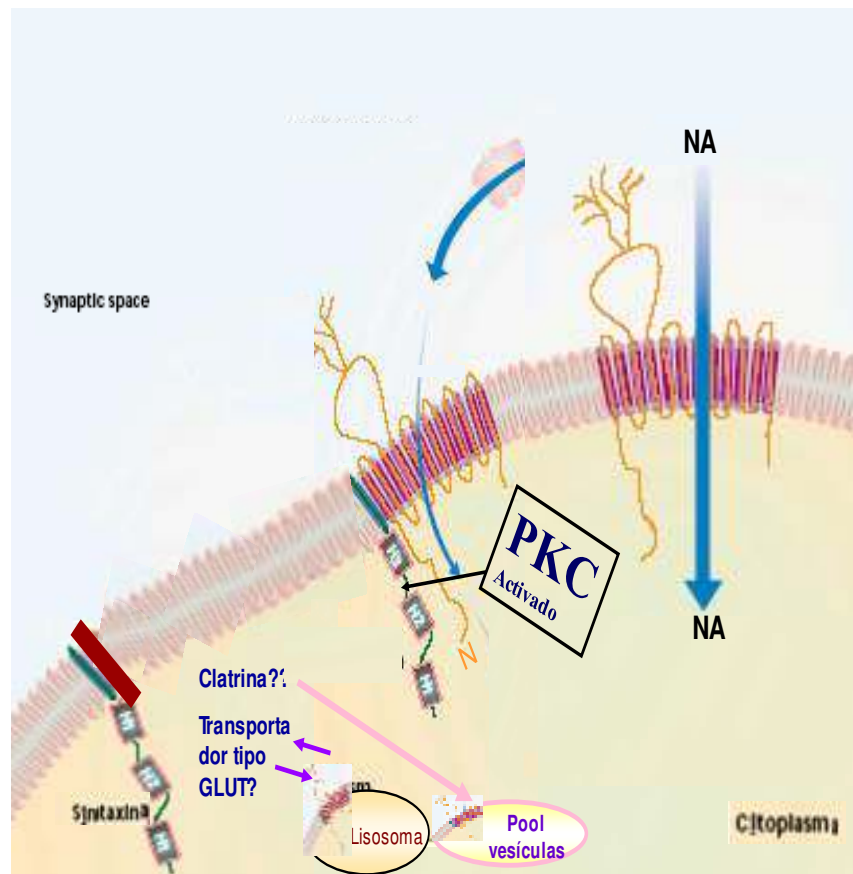


Figura 4: Mecanismo de Internalización Reciclada o degradación de la NET (Modificado de Sung y Blackely, 2007). NA Noradrenalina PKC proteína quinasa C

Ahora bien ¿Cuales son los finos mecanismos por los cuales los neurotransmisores y el transportador son regulados?

El NET se localiza junto con la SNAP-25 y sinaptofisina en las varicosidades axonales. Cuando se produce el enlace entre ambos se forma un complejo y se libera el transportador de la membrana (Schroeter y col. 2000, Quick , 2006; Ramamoorthy y col., 2011). La formación de los complejos SNARE/ syntaxina y SNARE/ SNAP-25 son transitorios y forma dímeros 1:1 (Fasshauer y Margittai, 2004.). La terminación de los residuos N- terminales tanto de la syntaxina como de SNAP son esenciales para la formación de dichos dímeros (Fig 5). El Ca^{2+} desencadena la formación de complejos SNARE entre SYN A₁, VAMP, SNAP-25, y produce la fusión de la membrana e influye directamente en las interacciones de la SYN A₁ presináptica con otras proteínas como sinaptotagmina, sincollina, y los canales de Ca^{2+} voltaje dependientes (Chen y col., 1999; Sheng y col., 1996, Ramamoorthy y col., 2011). Sung y Blakely, 2007 demostraron que existen moléculas de señalización que junto con el Ca^{2+} intracelular

están relacionadas con las interacciones NET/SYN A₁. Las citadas moléculas son: la proteína Munc13 y los canales de Ca²⁺ (Fujita y col., 1996; Sung y Blackely, 2007). Posiblemente, Ca²⁺ desencadena la fusión de las vesículas que contienen el NET. Paralelamente, a través de la PKC, se desestabilizan complejos NET/SYN A₁ para aliviar la tensión producida en la SYN A₁ (Fig. 5).

Figura 5: Mecanismos de reciclado del NET (Modificado de Sung y Blackely, 2007) NA Noradrenalina, PKC: proteína quinasa C, Syn 1 A: Syntaxina 1ª, Ca²⁺ Calcio, Munc 13: Proteína que abre la unión de la syntaxina 1 del transportador.

En condiciones fisiológicas altas concentraciones de Ca^{2+} provocaría tanto la inserción del NET como la pérdida de la inhibición de la formación de complejos NET/ SYN A₁. La eliminación total de Ca^{2+} reduce la expresión NET en la superficie. (Sung y Blackely, 2007)

También existe una correlación entre la activación de la PKC y el aumento intracelular de los transportadores y la SYN A₁, siendo ésta última un regulador positivo de transporte y expresión en la superficie. Los activadores de la PKC o agentes que mantienen el estado de fosforilación, como los inhibidores de la fosfatasa, rápidamente reducen la capacidad de transporte de la amina (Jayanthi y Ramamoorthy, 2005, Jayanthi y col, 2006, Ramamoorthy y col., 2011).

✓ Regulación del NET

Se entiende por regulación de la función de un transportador al secuestro o expresión del mismo en la membrana plasmática (Mandela y Ordway, 2006, Ramamoorthy y col., 2011). La misma se realiza a través de múltiples señales intracelulares realizadas por segundos mensajeros, fosfatasas y kinasas (Sung y Blackely, 2007, Ramamoorthy y col., 2011). La fosforilación se realiza mediante la activación de quinasas, siendo las que se encuentran más implicadas en este proceso, la PKA, PKC, Mitogen-activated protein kinasa (MAPK), CamK II y la desfosforilación es producida por las proteínas fosfatasas (Jayanthi y col, 2006, Mandela y Ordway, 2006, Ramamoorthy y col., 2011).

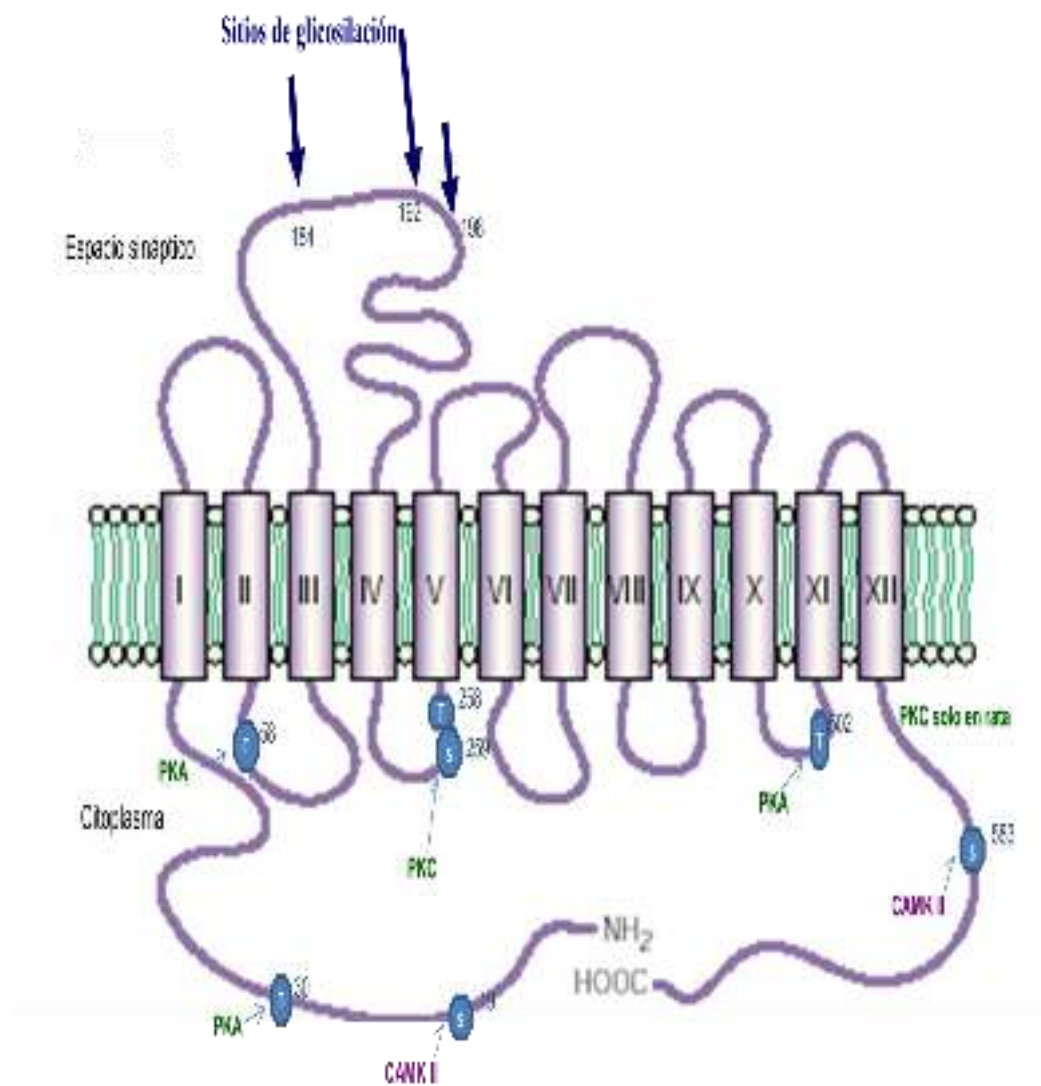
Diversos autores demostraron que la regulación de la función del transportador y la expresión del mismo en la membrana mediada vía PKC es un factor universal entre los transportadores de monoaminas (Sung y Blackely, 2007, Mandela y Ordway, 2006, Ramamoorthy y col., 2011). Esta universalidad se explica debido a la existencia de una estrecha similitud en las secuencias de aminoácidos entre transportadores, tal como ocurre con los de GABA, glicina, NA y 5-HT (Robinson, 2003). En dicha secuencia los sitios potenciales para la fosforilación del NET debida a la acción de PKC estarían ubicados en Serina 259 (Ser-259) y la Threonina 258 (Thr-258) (Jayanthi y col, 2006, Mandela y Ordway, 2006, Ramamoorthy y col., 2011, Wenge y Bönisch, 2013), dentro de la porción intracelular del transportador, en las terminales amino (entre TM4 y TM5) y carboxilo (aminoácido 579 solo en la rata), en la porción citoplásmica como se observa en la Figura 7 (Ramamoorthy y col., 2011). Mediante la mutación de los sitios Thr-258 y Ser-259, se comprobó que existe un bloqueo de la fosforilación inducida por la PKC de manera significativa (60%), pero no

completamente (Jayanthi y Ramamoorthy, 2005). Los resultados obtenidos hasta el presente nos muestran que la activación de la PKC produce la inhibición de la función del NET (Sung y Blackely, 2007, Mandela y Ordway, 2006, Ramamoorthy y col., 2011).

Por otra parte, se ha demostrado que el AMPc regula el NET y su función mediante el análogo de AMPc, el 8 Br-AMPc, que induce una disminución, concentración dependiente, de recaptación de [³H]NA en células cromafines de médula adrenal bovina (Mandela y Ordway, 2006). También se comprobó que la regulación mediada por AMPc del NET en células PC12, puede resultar de un cambio conformacional del transportador y por ello se produce una disminución de la V_{max} del transportador sin afectar la afinidad (K_m) por la NA y sin cambiar el nivel de expresión neta de la proteína en la superficie celular (Mandela y Ordway, 2006, Bönisch y Brüss, 2006). Otras proteínas involucradas en la regulación del NET son las protein fosfatasas (PP) responsables de los procesos de desfosforilación, que en conjunto con las diferentes quinasas que afectan la función de este transportador, se encargan de mantener el delicado equilibrio entre el estado de fosforilación y desfosforilación. En este sentido, se demostró que exponiendo al conducto deferente a la acción de un inhibidor de la proteína fosfatasa 1 y 2A (PP1 y PP2A) (ácido okadaico, OA), se produce una disminución en la recaptación de la NA que luego por inmunoprecipitación revelan la presencia de la formación de un complejo NET / PP en los extractos del mismo tejido lo que impediría la interacción de las fosfatasas con el transportador (Bauman y col., 2000). Dicha interacción entre PP y el NET estabilizaría al transportador y su expresión en la superficie de la membrana. Holton y colaboradores (2005) reportaron que dichos sitios de fosforilación se encuentran en los residuos de los aminoácidos 584-593 del dominio C-terminal del NET. Las mutaciones en esta secuencia provoca el bloqueo de la internalización del transportador (Holton y col., 2005).

Por su parte, la fosforilación mediada por la CamKII es importante en la modulación de la internalización del transportador y en la actividad del mismo, en respuesta a un estímulo sobre el receptor, el neurotransmisor y a los psicoestimulantes (Apparsundaram y col., 1998, 2001; Xu y col, 2000; Bauman y col., 2000, Vaughan, 2004; Jayanthi y col., 2004; 2006; Samuvel y col., 2005; Gether, 2006, Sung y Blackely, 2007, Xu y col, 2007, Ramamoorthy y col., 2011). Los sitios donde se realiza ésta fosforilación son la serina 583 y la tirosina 19 ubicadas en la región amino y carboxilo terminal, respectivamente (Brüss y col., 1997, Ibersen, 2006; Ramamoorthy y col., 2011) (Fig 6).

Diversos autores, utilizando diferentes modelos, documentaron una amplia variedad de mecanismos que regulan la NET. Los mismos se citan en forma resumida en la tablall.



*Figura 6: Esquema del NET. Sitios de glicosilación y de acción de diferentes quinasas (Modificado de Ibersen, 2006). **CaMK II**: quinasa dependiente de Ca^{2+} - Calmodulina **PKA**: proteína quinasa A **PKC**: proteína quinasa C. **T**: Tirosina **S**: Serina*

Tabla II. Ejemplos de algunos mecanismos de acción que actúan sobre la cinética del NET y su expresión sobre la superficie celular. (Mandela y Ordway, 2006)

Messenger System	Agent	Cell type	Exposure Time	NE Uptake	NET Kinetics	Cell Surface Expression	NET mRNA	References
PKC	βPMA	SK-N-SH	30 min	↓	↔ K_m ↓ V_{max}	↓	–	Apparsundaram <i>et al.</i> (1998a)
	βPMA	COS-7	30 min	↓	–	–	–	Bönisch <i>et al.</i> (1998)
		(transfected with hNET, hNET, hNET _{s250A})						
	βPMA	COS-7	24 h	↓	↔ K_m ↓ V_{max}	–	–	Bönisch <i>et al.</i> (1998)
		(transfected with hNET, hNET, hNET _{s250A})						
	βPMA	SK-N-SH-SY5Y	24 h	↓	↔ K_m ↓ V_{max}	↓	–	Bönisch <i>et al.</i> (1998)
	βPMA	Placental trophoblasts (rat)	30 min	↓	↔ K_m ↓ V_{max}	↓	–	Jayanthi <i>et al.</i> (2004)
cAMP/PKA	βPMA	HEK293.LLC-PK1, (stably transfected)	30 min	↓	↔ K_m ↓ V_{max}	↓	–	Apparsundaram <i>et al.</i> (1998b)
	cAMP analogues (8Br-cAMP, db-cAMP)	SK-N-SH-SY5Y	15 min, 24 h	↔	–	–	–	Bönisch <i>et al.</i> (1998)
	cAMP analogues (8-pCT-cAMP, Rp-8-pCT-cAMP)	SK-N-SH cells	40 min	↔	–	–	–	Apparsundaram <i>et al.</i> (1998a)
	8-Br-cAMP	Chromaffin cells	25 min	↓	–	–	–	Bunn <i>et al.</i> (1992)
	dbcAMP	PC12 cells	15 min, 24 h	↓	–	–	↓ (24 h)	Bryan-Luka <i>et al.</i> (2001)
	dbcAMP	COS-7, transfected with rat NET	15 min	↑	–	–	–	Bryan-Luka <i>et al.</i> (2001)
	dbcAMP	COS-7, transfected with hNET	24 h	↑	–	–	–	Bryan-Luka <i>et al.</i> (2001)
	Forskolin	SK-N-SH-SY5Y	15 min, 24 h	↔	–	–	–	Bönisch <i>et al.</i> (1998)
	Forskolin	Chromaffin cells	25 min	Biphasic effect ↑↓	–	–	–	Bunn <i>et al.</i> (1992)
	Forskolin	PC12 cells	15 min	↓	↔ K_m ↓ V_{max}	↔	–	Bryan-Luka <i>et al.</i> (2001)
	Forskolin	PC12 cells	24 h	↓	?	–	↓	Bryan-Luka <i>et al.</i> (2001)
	Forskolin	COS-7 ratNET	15 min	↔	–	–	–	Bryan-Luka <i>et al.</i> (2001)
	Forskolin (100 μM)	COS7 ratNET	24 h	↑	–	–	–	Bryan-Luka <i>et al.</i> (2001)
	Forskolin	COS7 hNET	24 h	↑	–	–	–	Bryan-Luka <i>et al.</i> (2001)
	Cholera toxin	SK-N-SH-SY5Y	15 min, 24 h	↔	–	–	–	Bönisch <i>et al.</i> (1998)
	Cholera toxin	PC12	24 h	↓	–	–	–	Bönisch <i>et al.</i> (1998); Bryan-Luka <i>et al.</i> (2001)
	Pertussis toxin	Chromaffin cells	90min	↓	↔ K_m ↓ V_{max}	–	–	Bunn <i>et al.</i> (1992)
cGMP/PKG	8-br-cGMP	PC12, SK-N-SH-SY5Y	15 min	↔	–	–	–	Bryan-Luka <i>et al.</i> (2001)
CaM Kinase	KN93 (inhibitor)	SK-N-SH	40 min	↓	–	–	–	Apparsundaram <i>et al.</i> (1998a)

Tabla II. continuación

Messenger System	Agent	Cell type	Exposure Time	NE Uptake	NET Kinetics	Cell Surface Expression	NET mRNA	References
Dephosphorylation	Okadaic acid	Vas deferens (inhibitor)	30 min	↓	-	-	-	Bauman et al. (2000)
	Okadaic acid (inhibitor)	Placental trophoblast	30 min	↓	-	-	-	Jayanthi et al. (2004)
Nitric oxide pathway	SNAP (NOx donor)	PC12 and rat sympathetic neurons	1 h	↓	-	-	-	Kaye et al. (1997)
Vesicular shuttling	Syntaxin 1A antisense oligonucleotides	CAD-hNET	2 days	↓	?	?	?	Sung et al. (2003)
	BONT/C1	CAD-hNET, SK-N-SH, Vas deferens, C. cortex (rat)	1 h	↓	?	?	?	Sung et al. (2003)
Other	Extracellular Ca ²⁺	PC12 cells	10 min	↑	↓ K _m ↑ V _{max}	↑	?	Uchida et al. (1998)

Es interesante observar la discrepancia en los resultados, la que se puede explicar debido a los diferentes protocolos experimentales y/o modelos utilizados lo que muestra la dependencia no solo en el tejido o célula utilizada para el estudio sino que también la especie.

Por otra parte, podemos explicar los detalles de la regulación y la dinámica de la unión del transportador a la membrana mediante el estudio de la cinética. Los parámetros que se usan para dicho estudio son: la constante de afinidad (K_m) y la velocidad máxima (V_{max}). De ésta manera, las alteraciones cinética que se pueden observar en los parámetros son los cambios en la V_{max}, con poco o ningún cambio significativo en la K_m (Bönisch y Brüss, 2006, Wenge y Bönisch, 2013). Además, la reducción en los valores de V_{max} sugiere el silenciamiento de las proteínas de transporte presentes en la membrana plasmática o cambio de los niveles de expresión en la superficie de las células mediada por endocitosis. Estos procesos se producen ya sea por el reciclado o la desinserción de las proteínas transportadoras de la membrana plasmática (Bönisch y Brüss, 2006, Wenge y Bönisch, 2013).

Por el contrario, el aumento de Vmax se explica por la inserción en la membrana plasmática de las proteínas transportadoras (Bönisch y Brüss, 2006, Wenge y Bönisch, 2013).

NET y su participación en diversas patologías

Distintos estudios muestran que las alteraciones en el funcionamiento del NET se asocian a patologías neurológicas tales como el trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH), enfermedad de Alzheimer y trastorno depresivo mayor (TDM), así como también en diversas enfermedades cardiovasculares como la hipertensión arterial (Gulyás y col., 2010, Robertson 2013, Marecos y col, 2014, Rudnick y col., 2014, Chi-Yung Shang y col., 2015; Hohmann y col. 2015, Liu y col, 2015; Shang y col. 2015).

Los fundamentos por lo que las investigaciones apuntan a la importancia potencial de los SLC6A2 en la fisiopatología de la TDAH es, en primer lugar, porque existe una alteración en la funcionalidad del NET y por ende de la captación de la NA (Bönisch y Brüss, 2006, Kim y col., 2006, Marecos y col, 2014); en segundo lugar, se comprobó que existe una desregulación de la recaptación tanto de la DA como NA en la corteza prefrontal (Moron y col., 2002); en tercer lugar, un medicamento eficaz para el TDAH es la atomoxetina, la cual inhibe la acción del NET, aumentando así la concentración de NA en el espacio sináptico y de esta manera produce sus efectos terapéuticos. Finalmente y en cuarto lugar, varios estudios demuestran la existencia de polimorfismos genéticos de SLC6A2 lo que se atribuye a diferentes respuestas al tratamiento en niños con TDAH (Ramos y col., 2009; Renner y col., 2011, Yang y col., 2013, Marecos y col, 2014, Hohmann y col. 2015, Liu y col, 2015; Shang y col. 2015). Chi-Yung Shang y col. (2015) reportan nuevas asociaciones de haplotipos rs36011 (T) / rs1566652 (G) de SLC6A2 en pacientes con diagnóstico de TDAH.

Por su parte en el Alzheimer se ha comprobado que disminuye la densidad del NET en diferentes estructuras cerebrales (Gulyás y col., 2010). Los cambios de dicha densidad del NET puede ser resultado de polimorfismo genético del transportador, envejecimiento fisiológico del transportador o los efectos farmacológicos producidos por diferentes fármacos o drogas de abuso (Klimek y col., 1997; Tellioğlu y Robertson, 2001, Gulyás y col., 2010). Por otra parte también se ha comprobado que el locus coeruleus puede sufrir degeneración temprana en el proceso de la enfermedad Alzheimer, por lo que el NET parece ser un biomarcador útil de la enfermedad (Robertson 2013).

Por su parte, existen claras evidencias que en la depresión hay una disfunción de DA, NA y 5-HT. Sobre éstas evidencias hay una denominada “hipótesis monoaminérgica de la depresión” (Grippe y Johnson, 2009). De ésta forma la mayoría de los estudios sobre la etiología de los trastornos psiquiátricos como el TDM demostraron varios polimorfismos del NET, en especial en T-182C y G1287A. El polimorfismo T-182C se encuentra en la región promotora del NET y puede regular la actividad transcripcional mediante la modificación de la afinidad de unión de factores de transcripción al ADN. El polimorfismo G1287A es una mutación silenciosa situada en el exón 9. Los estudios han concluido que los alelos G y A son funcionalmente idénticos (Yang y col., 2004; Song y col., 2011), la variante alélica G se asoció con una mayor concentración del principal metabolito de la NA, el 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG), en el LCR de voluntarios sanos (Johnson y col., 1998), lo que sugiere que el alelo G / A regula la transmisión de la NA. Por su parte, para tratar el TDM, el NET es uno de los blancos de los antidepresivos tricíclicos, inhibiendo selectivamente la recaptación de NA (Benmansour y col., 2004; Vaishnavi y col., 2004;.. Min y col., 2009a).

Por otra parte, los estudios sobre la genética del NET y su asociación con las enfermedades cardiovasculares son escasos (Schroeder y Jordan, 2012). Al respecto, se ha encontrado en poblaciones de origen japonés y caucásicos una asociación entre un polimorfismo en la región promotora del gen 3 del NET y la existencia de hipertensión (Ono y col., 2003, Schroeder y Jordan, 2012, Zolk y col., 2012). Mientras que estudios genéticos de pacientes con deficiencia de NET, sugieren fuertemente que NET puede contribuir a la enfermedad cardiovascular humana (Schroeder y Jordan, 2012). Sin embargo, gran parte de la información sobre cómo el NET afecta el sistema cardiovascular se ha obtenido de estudios farmacológicos con inhibidores selectivos y no selectivos del NET. Juntos, estos estudios sugieren que NET regula el sistema cardiovascular a través de acciones tanto a nivel del SNC como periférico.

1.2- Hipotálamo

El hipotálamo (del griego, *ὑπό*: 'debajo de', y *θάλαμος*: 'cámara nupcial, dormitorio') se ubica en la región diencefálica, en la base del cerebro, específicamente próxima a la silla turca. Ventralmente está cerca del tálamo y el límite dorsal está definido por un plano horizontal a través de la techo del tercer ventrículo. Se continúa, lateralmente, con la amígdala y en sentido caudal con el tracto óptico que lo separa de la amígdala (Palkovits y col., 1974; 1988) como se observa en la Fig 7 .

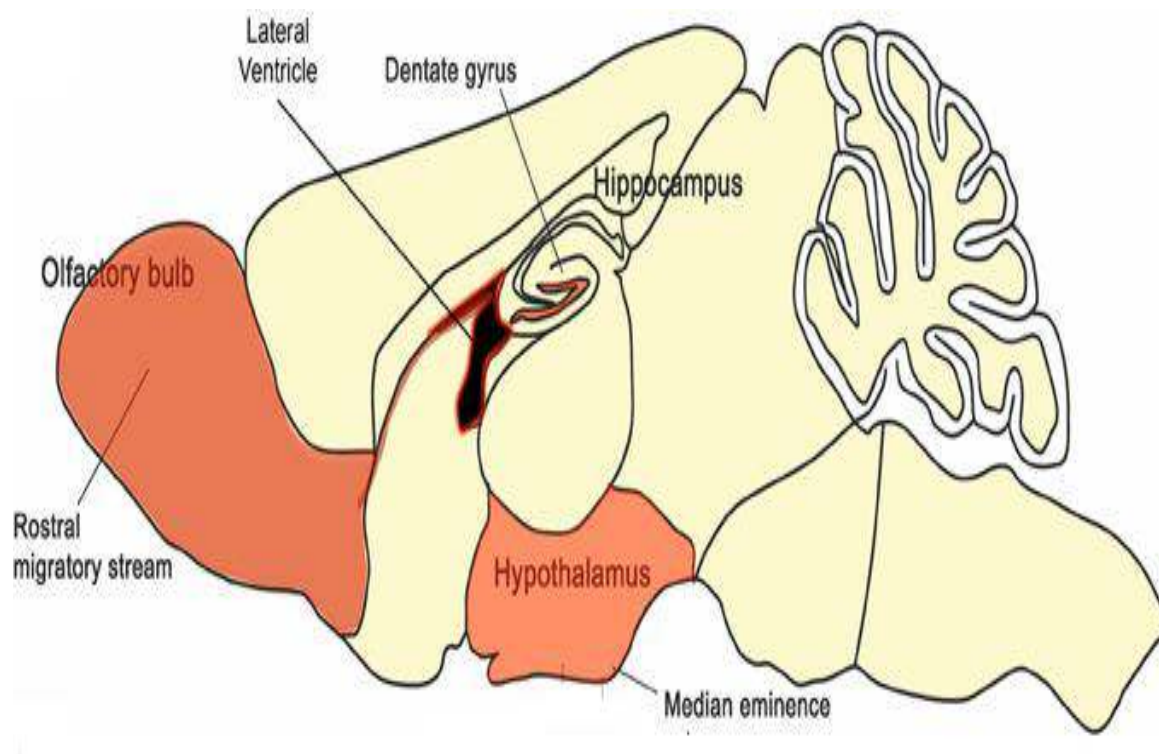


Figura 7: Ubicación anatómica del hipotálamo de rata

Palkovits y col. (1974; 1988) ubican al hipotálamo como la región que se extiende entre el área pre-óptica y el mesencéfalo. Esta región diencefálica comienza aproximadamente a partir de los 0.6 a los 0.7 μm detrás del punto cero de referencia o bregma, como una continuación caudal del área pre-óptica. Los cortes coronales de cerebro que contienen núcleos hipotalámicos se extienden aproximadamente 900 μm por detrás del bregma y hasta la treceava sección coronales subsiguientes, culminando en los cuerpos mamilares (*Palkovits y col., 1974; 1988*).

El hipotálamo es considerado como un centro integrador y regulador de diversas actividades conductuales como los comportamientos agresivos, de defensa y reproductivo. Regula también funciones fisiológicas como las del sistema cardiovascular, la composición corporal, el equilibrio hidrosalino, la termorregulación y el sistema endócrino todas indispensables para la sobrevivencia del individuo (*Oparil y col., 1995, Stojilkovic y Catt, 1995 Morrison y col., 2008*).

A pesar que el Hipotálamo representa solo el 1 % de la masa total del encéfalo, es considerada como la estructura de regulación más importante (*Oparil y col., 1995, Stojilkovic y Catt, 1996; Morrison y col., 2008*). No resulta extraño que sea una estructura sumamente compleja, que posee diversas fuentes de información aferentes, y que en determinadas circunstancias pueda gobernar no sólo la actividad endócrina y autonómica sino además, alcanzar un control de la actividad conductual (*Stojilkovic y Catt, 1996; Drevets y col., 2008*).

Debido a la gran controversia acerca de las divisiones y subdivisiones del hipotálamo, tomamos la clasificación de Palkovits y col. (1974; 1988). Según éstos autores podemos dividir al hipotálamo en anterior, medio y posterior.

1.2.1- Hipotálamo anterior (HA)

Esta región está compuesta por diversos núcleos que se citan a continuación: núcleo supraóptico (SON), área anteroventral del tercer ventrículo (AV3V), núcleo periventricular y el núcleo hipotalámico anterior.

El área AV3V tiene como principal componente el núcleo preóptico al cual llegan aferencias de los órganos circunventriculares, del bulbo olfatorio, de los núcleos parabraquiales, del núcleo del tracto solitario y los núcleos catecolaminérgicos de la protuberancia y del bulbo raquídeo (*Saper y col., 2003*). La ablación de éste área AV3V produce hipertensión fulminante, por

lo que éstas conexiones convierten a esta región en el área del control reflejo de la presión arterial, incluyendo los barorreceptores y también algunos componentes del reflejo renal (*Morrison y col., 2008*). También se involucra a ésta región en la regulación de la homeostasis de fluidos y electrolitos, dado que contiene neuronas reguladas por ANP (péptido natriurético atrial) y de ésta manera modifican la liberación de oxitocina que es una potente hormona vasodilatadora (*Saper y col., 2003; Morrison y col., 2008*).

El área preóptica del HA se ubica aproximadamente entre los 600-700 hasta los 900 μm por detrás del bregma y está constituida por los núcleos preóptico periventricular, preóptico medio, núcleo supraóptico preóptico, del núcleo anteroventral periventricular.

El SON recibe aferencias de la retina y varios estudios describen su función en el control circadiano y ritmos diurnos en roedores (*Morrison y col., 2008*). Teniendo en cuenta que los ritmos biológicos carecen de modulación por feedback (*Zucker, 1983*), el SON recibe muy pocas aferencias. Sin embargo, la porción ventral de este núcleo recibe una gran aferencia serotoninérgica del núcleo del rafe del encéfalo medio (*Conrad y col., 1974; Moore y col., 1984; Moga y col., 1997*) y una proyección de la parte ventral lateral del núcleo geniculado (*Swanson y col., 1987; Moore y col., 1984; Watts y col., 2008*). Si se produce la estimulación del SON induce una respuesta depresora como así también una inhibición de la liberación de vasopresina, sugiriendo una importante función reguladora de la presión arterial (*Grindstaff y col., 2001a, b*).

El núcleo hipotalámico anterior es uno de los núcleos más grandes de esta región hipotalámica (*Palkovits y col., 1974; 1988*), limita rostralmente con el núcleo preóptico medial (900 μm), rostrolateralmente con el núcleo supraquiasmático y caudalmente con el núcleo hipotalámico ventromedial (2100 μm). Se considera que el centro del núcleo hipotalámico anterior es la intersección entre la línea imaginaria que bisecciona el tercer ventrículo y otra perpendicular al quiasma óptico. Este último que proyecta a la zona medial del diencefalo cumple con funciones fundamentales en la regulación de la presión arterial tanto en estados fisiológicos como fisiopatológicos (*Risold, 2003*).

La parte medial del núcleo hipotalámico anterior es la continuación caudal del núcleo preóptico medial y se localiza medialmente al núcleo hipotalámico periventricular muy cerca del tercer ventrículo. El núcleo hipotalámico anterior posee un conjunto de conexiones complejas con otras partes de la zona medial del diencefalo, escasas aferencias desde la zona lateral del

diencéfalo, y solo una aferencia limitada desde las regiones telencefálicas como el subiculum ventral, núcleo de la estría terminal y la parte ventral del núcleo septal lateral (Swanson, 1987). El patrón total de las proyecciones desde cada subdivisión del núcleo hipotalámico anterior es bastante similar. La mayor de las eferencias de este núcleo es aquella que proyecta a la zona medial del diencéfalo (Risold, 2003).

Existen eferencias hacia los núcleos paraventricular y periventricular del hipotálamo y una fuerte proyección descendente que termina en la materia gris periacuaductal. Se observa que tanto en ratas normotensas como en hipertensas, los receptores $\alpha 2$ -adrenérgicos contribuyen a la función simpatoinhibitoria del núcleo hipotalámico anterior ya que la liberación de NA en este núcleo induce la estimulación de dichos receptores produciendo una disminución de la presión arterial (Wyss y col., 2001; Oparil y col., 1995; 1996; Peng y col., 1996; 2003). También se observó que la estimulación eléctrica del HA disminuye la presión arterial en varios modelos animales hipertensos (Risold, 2003). Además, lesiones en el área hipotalámica anterior incrementan la presión arterial (Oparil y col., 1995; 1996).

Se comprobó que éste núcleo posee un papel importante en el control de la respuesta cardiorrespiratoria y la homeostasis hidrosalina (Saper y col., 2003) y recibe grandes aferencias del órgano subfornical y del núcleo parabraquial (Lind y col., 1982; Saper y col., 2003; Duan y col., 2008). A su vez, emite proyecciones al núcleo paraventricular y al grupo de células magnocelulares, como también al núcleo hipotalámico dorsomedial (Duan y col., 2008).

1.2.2- Hipotálamo medio

El hipotálamo medio comprende el núcleo retroquiasmático, el núcleo paraventricular, la eminencia media, el núcleo arcuato y los núcleos ventromedial, dorsomedial y perifornical.

No se describirán los mencionados núcleos debido a que los mismos no son objeto de estudio en el presente trabajo de Tesis por sus efectos complejos y dispares sobre la función cardiovascular.

1.2.3- Hipotálamo posterior (HP)

El HP está constituido por los núcleos pre y supramamilares, el núcleo hipotalámico posterior y el núcleo mamilar prelatel.

El núcleo premamilar se divide en núcleo dorsal y ventral, localizándose en la hendidura mamilar del tercer ventrículo inmediatamente caudal al núcleo hipotalámico ventrolateral y rostral al cuerpo mamilar. El núcleo premamilar dorsal se encuentra caudal a la porción posteromedial del núcleo ventromedial a los 3900 μm por detrás del bregma y es rodeado por el vértice dorsomedial de la hendidura inframamilar y ventralmente, vecina a la subdivisión IV del núcleo del arcuato. Este núcleo se extiende lateralmente hasta el fórnix y el tracto mamilotalámico y recibe la mayor aferencia desde núcleo hipotalámico anterior (*Saper y col., 2003*), razón por la cual recibe indirectamente aferencias provenientes de la corteza prefrontal, la amígdala y el hipocampo. También recibe aferencias del núcleo hipotalámico ventrolateral, de la región perifornical, de las áreas infralímbicas y prelímbicas y del núcleo septal lateral (*Comoli y col., 2000*). El núcleo premamilar dorsal proyecta hacia tálamo anterior y el tronco encefálico como también al núcleo hipotalámico anterior, a la materia gris periacueductal, al coliculus superior y a la parte adyacente de la formación reticular (*Duan y col., 2008*). Debido a las conexiones mencionadas este núcleo es considerado un integrador de la información proveniente de la zona de los núcleos medios y las regiones del cerebro relacionadas con la memoria espacial y con las respuestas de defensa y de temor (*Saper y col., 2003; Risold, 2003*).

El núcleo premamilar ventral es más extenso en la zona rostromedial que en la zona dorsal y se localiza entre las 3900 y 4200 μm posterior al bregma, continuo a la porción posterolateral del núcleo ventromedial, limitando lateralmente con el núcleo arcuato y ventralmente a la zona dorsal del núcleo premamilar (*Gurdjian, 1927*). Dentro de las aferencias del núcleo premamilar ventral que más se destacan son las que provienen de la región del cerebro anterior que incluye al núcleo posterior de la amígdala, el núcleo preóptico medial y la porción posterodorsal del núcleo medial de la amígdala (*Paxinos y col., 1998; Comoli y col., 2000*). De esta manera, la información olfatoria de este último núcleo parece ser la mayor aferencia del núcleo premamilar ventral. Por otro lado, el núcleo premamilar ventral proyecta a los núcleos periventricular anteroventral y arcuato, como así también a otras regiones dimórficas sexuales

que lo inervan formando así un circuito de feedback (*Canteras y col., 1997*). Este núcleo forma parte de los circuitos que median el comportamiento y fisiología reproductiva (*Akesson y col., 1995, Comoli y col., 2000*).

El núcleo hipotalámico posterior es un grupo difuso de células que se localiza caudalmente al área hipotalámica dorsal y al núcleo dorsomedial. Se encuentra entre las secciones 3900 y 4200 μm , este núcleo ocupa toda el área medial hasta el tracto mamilotalámico, limitando dorsalmente con el tálamo posterior y ventralmente con los núcleos premamilar dorsal y mamilar medial. El núcleo hipotalámico posterior recibe aferencias de la amígdala, del septum y del hipocampo, aunque se cree que son proyecciones bidireccionales (*Abrahamson y Moore., 2001; Cavdar y col., 2001; Tsumori y col., 2006*). El núcleo hipotalámico posterior proyecta al cerebro anterior y a la región cortical relacionada con las estructuras límbicas, como por ejemplo las regiones insular, límbica, prelímbica de la corteza cerebral (*Cavdar y col., 2001*) e inerva a otras regiones subcorticales en el hipotálamo, tálamo, amígdala, septum y el cerebro anterior basal. Estas características sugieren que el núcleo hipotalámico posterior tiene una importante función en ciertos aspectos del comportamiento emocional (*Vertes y col., 1995*). Asimismo, el núcleo hipotalámico posterior posee una gran influencia en la regulación de la presión arterial y es considerado una de las regiones simpatoexcitatorias más relevante dentro del HP (*Cavdar y col., 2001*). En éste sentido se observó que la estimulación del núcleo hipotalámico posterior incrementa la actividad del sistema nervioso simpático y atenúa la bradicardia inducida por la activación del barorreflejo (*Cavdar y col., 2001*).

El núcleo supramamilar es el más caudal del hipotálamo, encontrándose inmediatamente dorsal a los cuerpos mamilares como su nombre lo sugiere (4500-4800 μm por detrás del bregma) y extendiéndose lateralmente hasta el tracto mamilotalámico. Si bien las aferencias aun no se encuentran bien definidas, se sabe que recibe conexiones de la porción ventral del núcleo septal, del núcleo preóptico medial y del núcleo supraóptico (*Swanson y col., 1987; Saper y col., 2003*). El núcleo supramamilar proyecta mayormente a las regiones telencefálicas, incluyendo el cortex entorrinal y el giro dentado, como también a otras regiones del hipocampo, del striatum y al núcleo central de la amígdala (*Swanson, 1997; Saper y col., 2003*).

Los cuerpos mamilares se dividen en el núcleo mamilar medial que ocupa la mayor parte de los cuerpos mamilares y en el núcleo lateral mamilar que se distingue por sus neuronas largas y

densamente tenidas. Sin embargo, estos núcleos no son considerados como parte del hipotálamo posterior.

El núcleo mamilar prelatelal (también llamado el núcleo magnocelular caudal o tuberomamilar) se localiza a los 3600-4500 μm y recibe aferencias del núcleo septal, del área preóptica y del núcleo ventromedial del hipotálamo medio (*Ericson y col., 1991, Tsumori y col., 2006*). El núcleo mamilar prelatelal posee proyecciones que se encuentran dispersas por varias zonas del cerebro por ejemplo la corteza, como así también proyecta a los ganglios de la base, al septum, a la amígdala, a ciertas zonas del tálamo, al cerebelo y varios núcleos del tronco encefálico. Sin embargo, las proyecciones más importantes de este núcleo son aquellas que inervan a otros núcleos del hipotálamo como el paraventricular y el supraóptico (*Ericson y col., 1991*) sugiriendo un importante papel en la regulación neuroendocrina y de la presión arterial.

1.3- Endotelinas

Las investigaciones realizadas por Hickey y col. (1985), en cultivos de células endoteliales de aorta bovina, son la primera evidencia de la presencia de una sustancia vasoconstrictora más potente que la angiotensina II. Posteriormente, en 1988, Yanagisawa y col. aislaron, purificaron e identificaron dicha sustancia endógena cuya actividad vasoconstrictora es la más potente conocida hasta el momento y a la que denominaron Endotelina (ET). Hasta el presente se identificaron tres isoformas que fueron denominadas ET-1, ET-2 y ET-3 (Fig 8)(Sokolosky y col., 1995; Kohan y col., 2009; Vatta y col, 2009; Watts S, 2010, Davenport y Maguire.; 2011; Kohan y col., 2011; Speed y Pollock; 2013, Maguire y Davenport, 2015, Vatta y col.; 2015).

La distribución de éstos péptidos es amplia, identificándose la ET-1 inmunorreactiva y su mRNA en los vasos sanguíneos, corazón, páncreas, hígado, riñón y en el SNC (Vatta y col, 2009; Watts S, 2010, Davenport y Maguire, 2011, Speed y Pollock; 2013, Maguire y Davenport, 2015, Vatta y col.; 2015). La ET-2 se encuentra principalmente localizada en el endotelio vascular sin embargo también se describió su presencia en riñón, corazón, placenta, útero y SNC (Davenport, 2002, Maguire y Davenport, 2015) Por su parte, la ET-3 se sintetiza se encuentra localizada principalmente en el SNC y en menor grado en adenohipófisis, intestino, páncreas e hígado (Vatta y col, 2009 Watts S, 2010, Davenport y Maguire.; 2011; Kohan y col., 2011; Speed y Pollock; 2013, Maguire y Davenport, 2015, Vatta y col.; 2015). Éstos péptidos no pueden atravesar la barrera hematoencefálica ya que son moléculas muy hidrosolubles, pero interrelacionan la periferia con el SNC a través de su unión a receptores que se encuentran en los órganos circunventriculares (Rossi y col., 1997; 2002; 2006; Vatta y col, 2009, Davenport y Maguire.; 2011; Kohan y col., 2011; Speed y Pollock; 2013; Maguire y Davenport 2015). En la actualidad se ha descrito la existencia de un sistema endotelinérgico en diferentes regiones y áreas del SNC en donde las ETs son sintetizadas localmente y actúan como neuromoduladores o neurotransmisores peptídicos o son liberados al LCR y de esta manera son transportados a diferentes regiones del encéfalo, comportándose como factores parácrinos (Rossi y col., 2002; 2006; Vatta y col, 2009, 2015).

La ET-1 no se almacena en los gránulos secretores dentro de las células endoteliales sino que se sintetizan y secretan directamente (*Goto, 2001*). Estímulos tales como la hipoxia, isquemia, el estrés inducen la transcripción del ARN mensajero (ARNm), la síntesis y secreción de ET-1 en cuestión de minutos (*Naidoo y col, 2004*). La vida media del ARNm es de aproximadamente 15 a 20 minutos, y la vida media plasmática de la ET-1 es de aproximadamente de 4 a 7 minutos; por lo tanto, las células vasculares pueden ajustar rápidamente la producción de ET-1, según lo requerido para la regulación del tono vascular. La ET-1 plasmática se elimina principalmente (80 a 90 por ciento) por los pulmones. También es producida por neuronas y astrocitos en el sistema nervioso central, células del endometrio, hepatocitos, mesangio renal, células de Sertoli y células epiteliales de la mama.

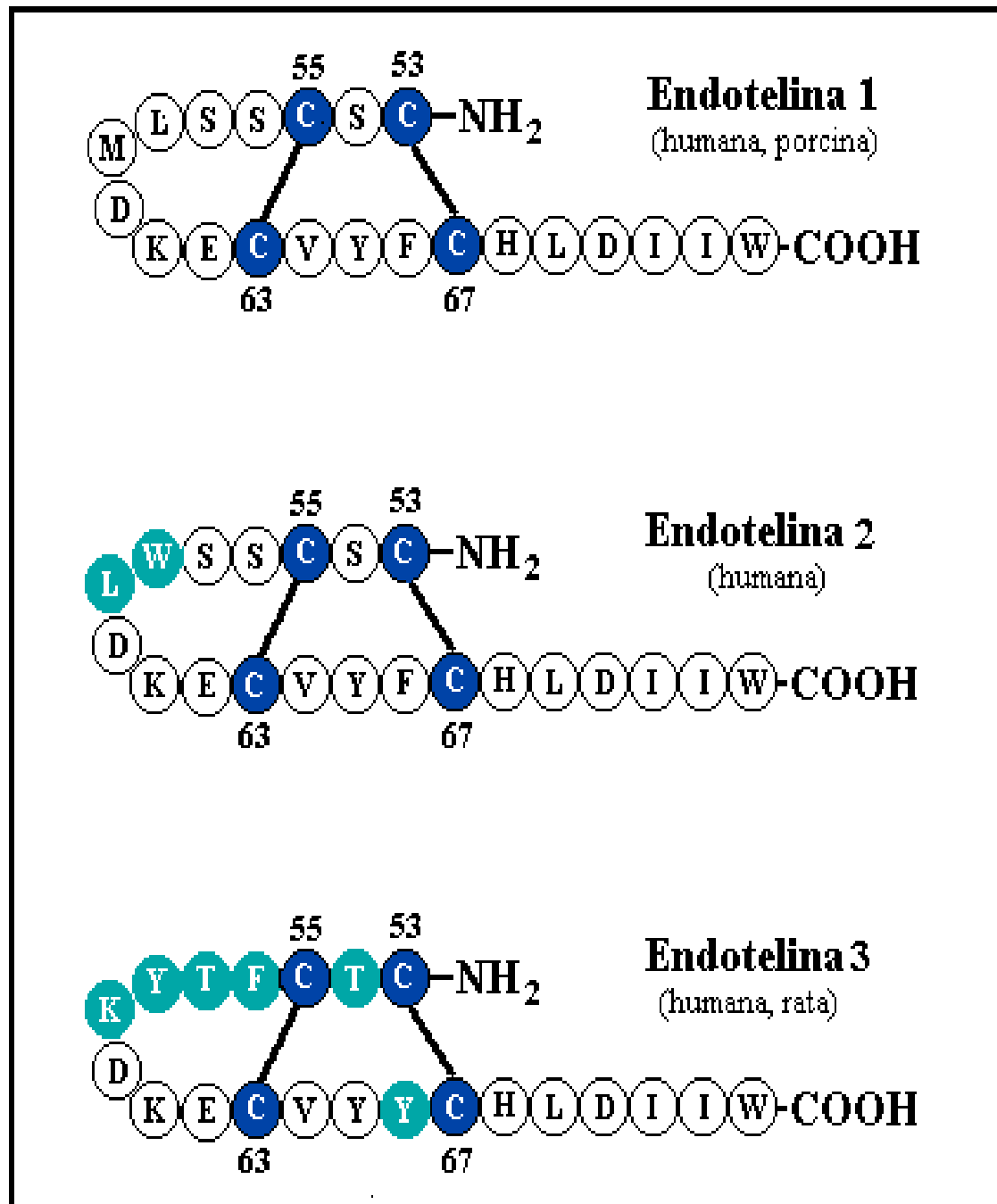


Figura 8: Estructura de los distintos isopéptido ET-1 ET-2 ET-3. Secuencia de aminoácidos de cada una de las isoformas. Los círculos celestes representan los residuos de aminoácidos diferentes de la secuencia de ET-1. Se incluye la unión de los puentes disulfuro que une la cisteína en posiciones 1-15 y 3-11 (Kohan y col, 2011).

1.3.1- Biosíntesis

Las ETs pertenecen a una familia de isopéptidos denominados ET-1, ET-2 y ET-3, que están constituidos por 21 aminoácidos unidos por dos puentes disulfuro (*Schneider y col., 2007; Vatta y col., 2009; Davenport y Maguire., 2011; Kohan y col., 2011; Speed y Pollock; 2013, Maguire y Davenport, 2015, Vatta y col.; 2015*) (Fig 8).

La biosíntesis se inicia como un pre-pro-péptido de 203 aminoácidos en rata (212 en humanos), denominado pre-pro-ET, que por acción de una endopeptidasa dibásica se transforma en la pro-ET también conocida como big-ET, de 39 amino ácidos. (*D'Orléans-Juste y col., 2003 a y b; Gössl y Lerman, 2006, Kawanabe y Nauli 2011*) como se observa en la Fig 9. La big ET-1 es, al menos, 100 veces menos activa que ET-1 en preparados vasculares y desplaza de la unión de sus receptores a la ET-1.

La conversión de Big ET a ET-1 es llevada a cabo por una enzima convertidora de ETs o ECE. Este es por lo tanto un paso crucial en la formación de estos péptidos y, en consecuencia, la inhibición de la ECE se ha visto como un paso por la que los efectos biológicos de la ET endógena podrá al menos verse disminuida. Este paso consiste en la ruptura de la unión entre Trp -Val para ET-1 y ET-2, o de Trp - Ileu para ET-3, por la ECE (*Davenport y Maguire., 2011; Kohan y col., 2011, Kawanabe y Nauli 2011*).

Existen diferentes isoformas de ECE (tabla III), todas son zinc metaloproteinasas unidas a membrana que pueden ser inhibidas por fosforamidón y agentes quelantes tales como el EDTA y EGTA (*Pollock y col.; 1991; 1993; Warner y col., 1992, Kuwaki y col., 1997*). La ECE-1 es activa a pH neutro y procesa tanto la big-ET-1 exógena como endógena (*Schmidt y col., 1994; Shimada y col., 1995*), mientras que la ECE-2 necesita un pH más ácido para ser activa y sólo procesa a la big ET endógena (*Emoto y col., 1995*). Ambas isoformas tienen una baja afinidad con la big ET-2 y big ET-3.

La distribución de las diferentes ECEs en el SNC es bastante extensa en los distintos tipos celulares, incluyendo las neuronas. Asimismo, la distribución de ECEs en la rata coincide con la localización de ET madura. Por otro parte, las regiones con mayor actividad de ECE dentro del SNC son el bulbo raquídeo y el hipotálamo (*Pollock y col.; 1991; 1993; Warner y col., 1992; Kawanabe y Nauli 2011*).

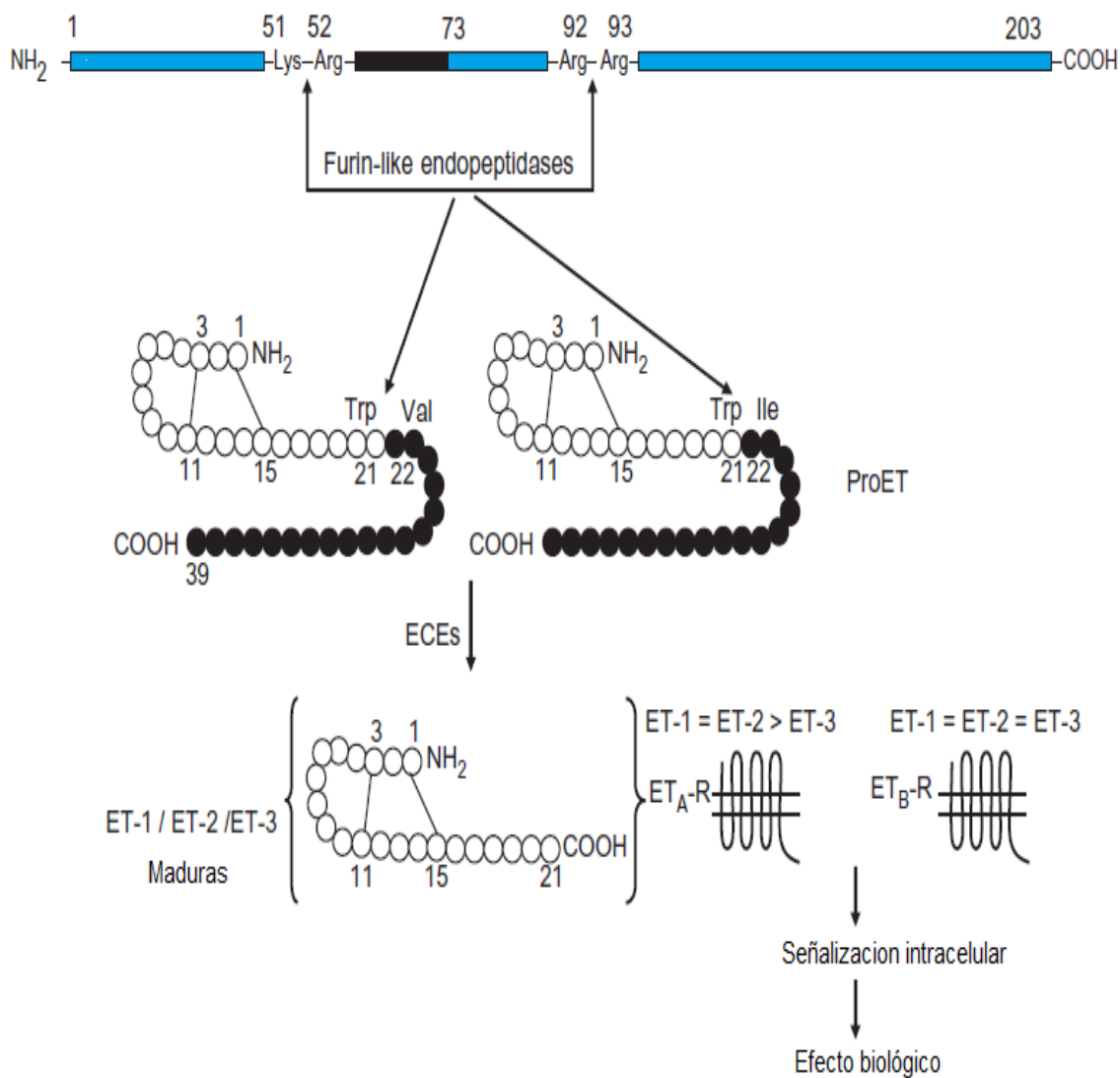


Figura 9: Ruta biosintética y afinidad por los receptores de ETs. ET-1, ET-2 y ET-3: Endotelina 1, 2, y 3; ACE: Enzima convertidora de endotelina; y ET_A-R y ET_B-R: receptor de endotelina tipo A y tipo B (según Vatta y col., 2015) .

Tabla III. Diferentes isoformas ECE, características y afinidad (Pollock y col.; 1993)

Characteristics and affinities of ECE isoforms.				
ECE isoforms	Localization	Cleavage of big-ET-1		References
		K_m (μ M)	V_{max}	
ECE-1*	Endothelial cells	1-2		Xu et al. 1994; Shimada et al. 1994; Schmidt et al. 1994
ECE-1a	Plasmic membrane	0.4-0.8	0.6-0.8 mol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹	Shimada et al. 1995; Schweizer et al. 1997
ECE-1b	Intracellular	0.4-0.5	0.1-0.7 mol·min ⁻¹ · μ g ⁻¹	Shimada et al. 1995; Schweizer et al. 1997
ECE-1c	Plasmic membrane	0.4-0.5	0.5 μ mol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹	Schweizer et al. 1997
ECE-1d	Plasmic membrane	1.26		Valdenaire et al. 1999
ECE-2 [†]	Secretion vesicles, endothelial cells	1-2		Emoto and Yanagisawa 1995
ECE-2a-1	Liver, kidney, adrenal gland, testis, and endothelial cells	n.d.		Ikeda et al. 2002
ECE-2a-2	Same as ECE-2a-1	n.d.		Ikeda et al. 2002
ECE-2b-1	Brain and adrenal gland	n.d.		Ikeda et al. 2002
ECE-2b-2	Brain and adrenal gland	n.d.		Ikeda et al. 2002
ECE-3 [‡]		0.14	7.4 pmol·min ⁻¹ ·mg protein ⁻¹	Hasegawa et al. 1998

Note: n.d., not determined.

*ECE-1 cleaves big-ET-1 to ET-1 with the following specificity: big-ET-1 > big-ET-2 > big-ET-3. One gene and four alternative promoters encode the four isoforms of ECE-1. Difference: N-terminal endings (role in cellular localization).

[†]ECE-2 cleaves big-ET-1 to ET-1 with the following specificity: big-ET-1 > big-ET-2 > big-ET-3. The gene has 59% homology with ECE-1.

[‡]ECE-3 shows no hydrolysis of big-ET-1 or big-ET-2 and is specific to big-ET-3.

[§]For big-ET-3.

1.3.2- Genes y su regulación

Se identificaron en el genoma de mamíferos tres genes que codifican la síntesis de las secuencias de la ET (Naidoo y col, 2004, Braash y col., 2009, Braash y Schartl, 2014). Por otra parte, en estudios de secuenciación del genoma humano, se encontraron tres genes en los cromosomas 6, 1, y 20, respectivamente (Naidoo y col, 2004; Kawanabe y Nauli 2011, Braash y Schartl, 2014). También se estableció que varios factores extracelulares podrían influenciar la producción de ET positiva y negativamente. Los factores que activan la vía de la PLC/PKC pueden activar la producción ET-1, a través de la unión de los proto-oncogenes jun y fos al elemento regulador de la transcripción del activador de la proteína -1 (AP-1) al promotor del gen de ET-1. Estos factores son:

insulina, trombina, angiotensina-II, vasopresina (Kohno y col., 1990b, Pollock, 2000, Kohan y col., 2011, Muniyappa y Yavuz, 2013; Briet y Schiffrin, 2013). Otros factores que promueven la producción de ET-1 son la ciclosporina, la Ad, cortisol, los mediadores de reacción inflamatoria y de la hipoxia. Además, la producción de endotelina es inhibida por el óxido nítrico, drogas donadoras de óxido nítrico y prostanoides a través de un aumento de GMPc, y los ANP a través de un aumento de GMPc (Fujisaki y col., 1995; Jiang y col., 2000, Kohan y col., 2011, Muniyappa y Yavuz, 2013; Briet y Schiffrin, 2013; Maguire y Davenport, 2015).

1.3.3- Estructura y receptores

Las ETs poseen semejanzas estructurales a la sarafotoxinas (SRTXs), las que son potentes péptidos cardiotóxicos aislados del veneno de la serpiente *Atractaspis enggadensis* (Saida y col., 1991, Davenport y Maguire.; 2011; Kohan y col., 2011 Kawanabe y Nauli 2011; Maguire y Davenport, 2015). La secuencia de aminoácidos de cada uno de los miembros de la familia exhibe una conservación en los mamíferos. Como se dijo anteriormente, las tres isoformas de ETs poseen 21 aminoácidos y dos puentes disulfuro entre residuos de cisteína (Figura 8), cuya pérdida genera la ausencia total de su actividad biológica y difieren en la estructura química y en la capacidad vasoconstrictora que poseen (Stojilkovic & Catt, 1996; Schneider & col., 2007; Khimji & Rockey, 2010).

La secuencia de aminoácidos de las ETs en humanos se muestra en la figura 8.

En lo que respecta a los receptores de las ETs, según la International Union of Pharmacology (IUPHAR), se los clasifica en dos subtipos denominados ET_A y ET_B y cuya secuencia aminoacídica se observa en la Figura 10 (Davenport, 2002; Masaki y col., 2004; Hyndman y col, 2009).

La secuencia de cDNA de ambos receptores fueron clonados 1990, ésta proteína es una molécula helicoidal de siete dominios transmembrana (Arai y col., 1990; Sakurai y col., 1990). Estos receptores pertenecen a la familia de los receptores Clase A los que se caracterizan por estar acoplados a proteína G. Tanto el receptor ET_A como el ET_B poseen un dominio NH₂ terminal extracelular y COOH terminal intracelular (Hyndman y col, 2009, Kallakuri y col., 2010; Mazzuca y Khalil, 2012).

El receptor ET_A se encuentra altamente expresado en el corazón (atrio > ventrículo), vasos sanguíneos y pulmones, en tanto que en SNC, hígado y riñón presenta menores niveles de expresión (Vatta y col, 2009; Kallakuri y col., 2010, Horinouchi y col., 2013, Vatta y col.; 2015). Por su parte Yamada y Kurokawa (1988) demostraron que el receptor ET_A se encuentra expresado en neuronas catecolaminérgicas. Este receptor presenta antagonistas específicos que permitieron su estudio, mientras que no posee hasta el presente un agonista específico (tabla IV) (Vatta y col, 2009; Watts S, 2010; Houde y col., 2011, Mazzuca y Khalil, 2012 Maguire y Davenport, 2015, Vatta y col.; 2015).

Por su parte el receptor ET_B se encuentra altamente expresado en el SNC y en menor grado en los pulmones, páncreas corazón y riñón (Vatta y col, 2009; Watts S, 2010, Mazzuca y Khalil, 2012, Vatta y col.; 2015). En lo que respecta a la farmacología de este receptor, el mismo presenta tanto agonistas (sarafotoxin 6c (S6C) e IRL1620 y BQ-3020) como antagonistas (BQ788, A192621, RES7011 y IRL2500) específicos (tabla IV) (Warner y col., 1992, Opgendorth y col., 1995; Sokolovsky, 1995 Hiley, 1997; Vatta y col, 2009, Mazzuca y Khalil, 2012; Maguire y Davenport, 2015, Vatta y col.; 2015).

La unión de las ETs a los receptores es rápida, específica y saturable y la disociación es lenta y no llega a ser del 100 % (Opgendorth y col., 1995; Hiley, 1997).

Existen una serie de diferencias entre los receptores ET_A y ET_B. El ET_A presenta alta afinidad por la ET-1 y en menor grado para ET-2 y ET-3 (ET-1 ≥ ET-2 > ET-3) mientras que el receptor ET_B, no es selectivo y presenta igual afinidad por los tres péptidos (ET-1=ET-2=ET-3) (Fig 9) (Davenport, 2002; D'Orleans-Juste y col., 2002; D'Orleans-Juste y col., 2003; Schneider y col., 2007; Vatta y col, 2009, Hyndman y col, 2009, Vatta y col.; 2015).

International Union of Pharmacology. XXIX

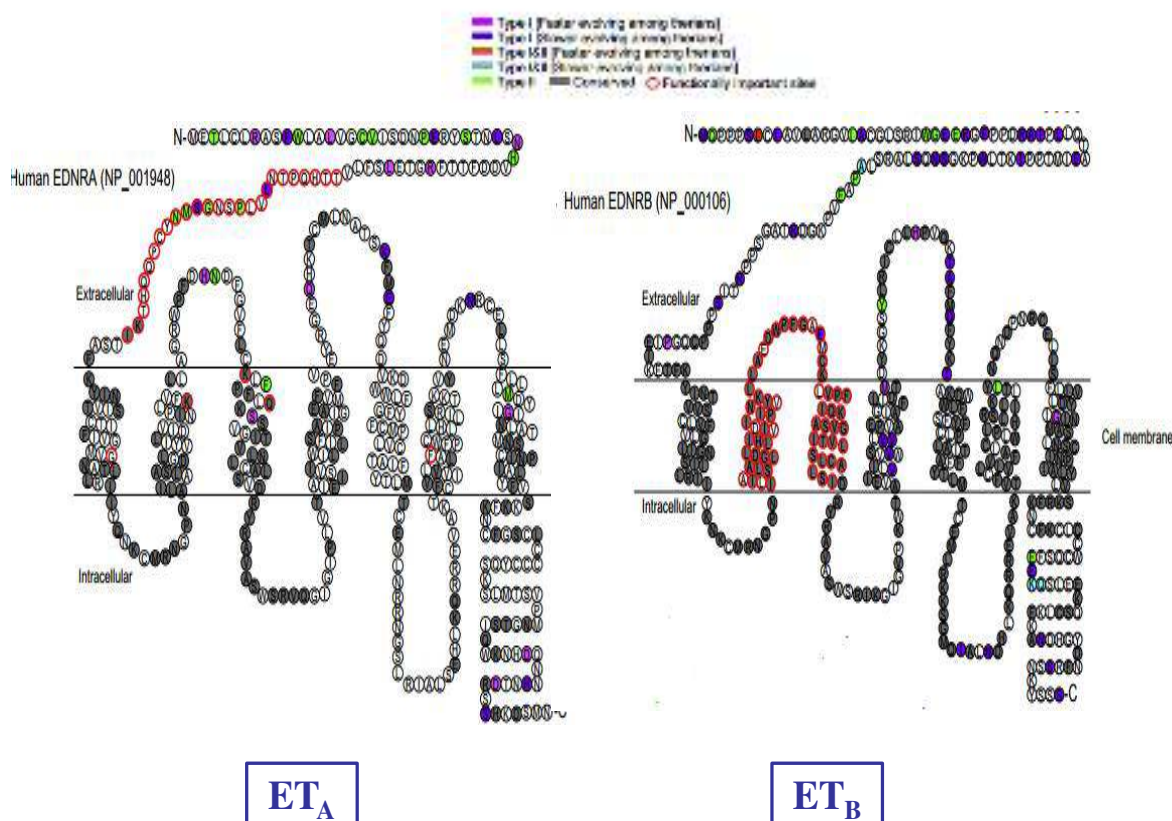
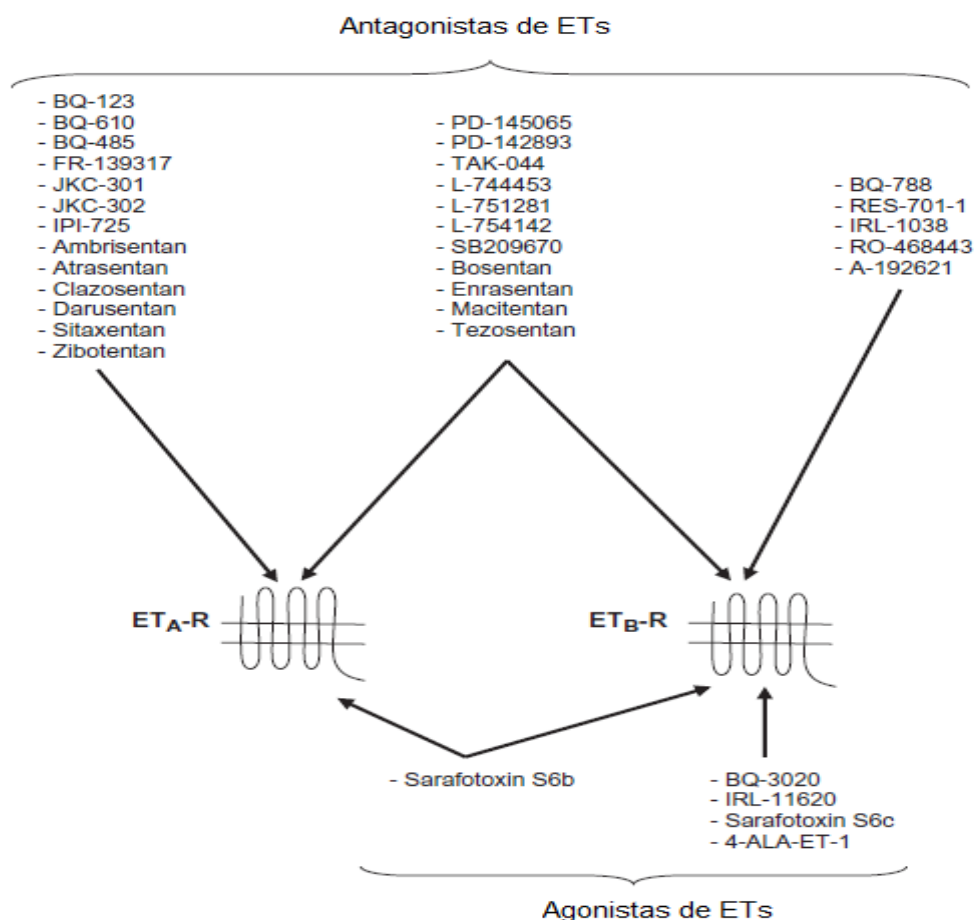


Figura 10: Estructura y secuencia de aminoácidos de los receptores clásicos para ETs en humanos. En rojo se muestran cuales son los aminoácidos funcionalmente importantes (Hyndman y col, 2009)

Diversos autores describieron la presencia de receptores con comportamientos atípicos frente a los distintos agonistas y antagonistas que definen a los receptores clásicos de ETs (*Nambi y col., 2000; Hatea y col., 2007; di Nunzio y col., 2002, 2004; Perfume y col., 2007, 2008; Watts S, 2010; Horinouchi y col., 2013,*) (tabla IV). Fue justamente por esta razón que se los denominó receptores atípicos o no-convencionales, ET_{AX} y ET_{BX}. Sin embargo, la IUPHAR aún no tiene adoptado formalmente esta nomenclatura debido a la ausencia de datos que apoyan la existencia de dos diferentes genes o proteínas que generen los distintos comportamientos farmacológicos (*Watts S, 2010*).

Tabla IV: Antagonistas y agonistas de receptor de ETs mas usados en investigación. ET_A-R y ET_B-R: receptor de Endotelina tipo A y receptor tipo B de ET (Vatta y col., 2015).



Algunos autores postulan que dichos receptores serían consecuencia de una homodimerización y/o heterodimerización de los receptores ET_A y ET_B, lo que hace que se comporten como unidad molecular y por lo tanto, tengan dicho funcionamiento atípico (Harada y col., 2002; Gregan y col., 2004; AbdAlla y col., 2005; Pollock y col., 2008; Böesen, 2008; Evans, 2008; Watts S, 2010). Particularmente Harada y col., (2002), observaron que los dos receptores para ETs pueden interaccionar entre sí, en aquellos tejidos que expresen los dos tipos de receptor. También demostraron la formación de un heterodímero ET_A/ ET_B con características similares a la

heterodimerización de receptores opiodes y de GABA. Dicha heterodimerización de receptores podría explicar en parte la respuesta atípica observada en diferentes tejidos en presencia de antagonistas y agonistas selectivos de ETs (Harada y col., 2002). Ésta dimerización no ocurre en los vasos de ratas ET_B deficiente (Mazzuca y Khalil, 2012)

Se postula que la dimerización podría realizarse a través del NH₂ terminal, los dominios heptahelicoidales, enlaces covalentes de cisteína en las terminales NH₂, o de la proximidad al COOH Terminal (Gurevich y Gurevich, 2008, Levoe y col., 2006.).

En 1993, Karne y col. clonaron y caracterizaron un receptor al que denominó ET_C, en el corazón de *Xenopus laevis* que presenta una elevada afinidad por la ET-3. Por su parte, diversos estudios de binding y funcionales sugieren la existencia de este supuesto tercer receptor, sin embargo aún no fue clonado en mamíferos (Cardell y col., 1994, di Nunzio y col., 2002, 2004; Perfume y col., 2007, 2008; Kumar y col., 2007; Watts S, 2010).

Respecto al comportamiento anómalo de los receptores, nuestro laboratorio estudió y documentó que en el HP de rata, tanto ET-1 como ET-3 incrementan la liberación neuronal de NA de manera concentración dependiente pero con la diferencia de que se unen y activan diferentes receptores y vías intracelulares. La ET-1 activa receptores de ETs llamados *atípicos* que incrementan la liberación de NA a través de un cross-talk entre PLC y PKA. Asimismo, la ET-3 también aumenta la liberación de la amina a través un receptor que no responde ni a los antagonistas ni a los agonistas de los clásicos receptores ET_A y ET_B (di Nunzio y col., 2004). Por su parte, también comprobamos en el HP, que ambas ETs disminuyen la actividad y expresión de TH a través de un receptor atípico (ET_{AX} o ET_{BX}) o del receptor ET_C. a corto plazo (Perfume y col., 2007) mientras que a largo plazo, en la misma hemiporción hipotalámica las ETs incrementan la actividad de la enzima por su unión a un receptor del mismo comportamiento (Perfume y col., 2008) en ratas normotensas. También se demostró que en los bulbos olfatorios de ratas normotensas, a corto plazo la ET-1 y ET-3 incrementan la actividad de TH de manera concentración dependiente, produciendo sus efectos a través de receptores atípicos o ET_C (Nabhen y col, 2009).

Recientes informes filogenéticos sugieren que el gen y la proteína del receptor ET_C se perdió en los mamíferos que se forman en placentas y marsupiales, por lo tanto no es relevante

para la fisiología humana y la farmacología (Braasch y col., 2009, Hyndman y col., 2009. Watts S, 2010, Braasch y Scharf, 2014). Esto indicaría que los efectos atípicos observados por nuestro laboratorio y por otros estudios no serían a través de un receptor ET_C, sino que habría que orientar el estudio hacia receptores ET_{Ax} o ET_{Bx} y o a la dimerización de los mismos. Por lo que es un tema que aún se encuentra en estudio y debate.

1.3.4- Mecanismos Intracelulares

La unión de las ETs a sus receptores pueden desencadenar múltiples vías de señalización en función de la proteína G activada (Gs, Gq, Go, Gi), así como el tejido y tipo celular implicado (Sokolovsky, 1995; Mathison e Israel, 2002; Motte y col., 2006; Mathison y col., 2007; Vatta y col, 2009, Watts S, 2010, Horinouchi y col., 2013, Vatta y col.; 2015) (Fig 12).

Por un lado, las ETs pueden activar la PLC, que se traduce en la hidrólisis fosfoinosítidos de membrana en 1,4,5 trifosfato de inositol (IP3) y diacilgliceroles (DAG). La unión de IP3 con sus receptores de alta afinidad en la membrana del retículo endoplasmático provoca la liberación de calcio desde las reservas intracelulares (Sokolovsky, 1995; Hynynen y col, 2006; Nilsson y col, 2008,, Horinouchi y col., 2013). El aumento en el calcio intracelular activa las proteínas quinasas de calcio dependiente y el aumento de DAG activa la proteína quinasa C (PKC) y también la fosfolipasa D (PLD) (Kawanabe y col., 2005). Varios estudios demuestran que ET-1 y ET-3 activan PLC en las neuronas (Plant y col., 2007; Vatta y col, 2009 Yamamoto y col, 2013), células de neuroblastoma híbridos, astrocitos (He y col, 2007;Yeung y col.,2013), hipotalámicos cultivadas, hipofisaria anterior, hipocampo, corteza cerebral y neuronas cerebelares (Sokolovsky, 1993, Plant y col., 2007; Yamamoto y col, 2013). PLC también se activa por ETs en el órgano subfornical y eminencia media (Mathinson Israel, 2004; Garrido Israel, 2007; Mathinson y col., 2007).

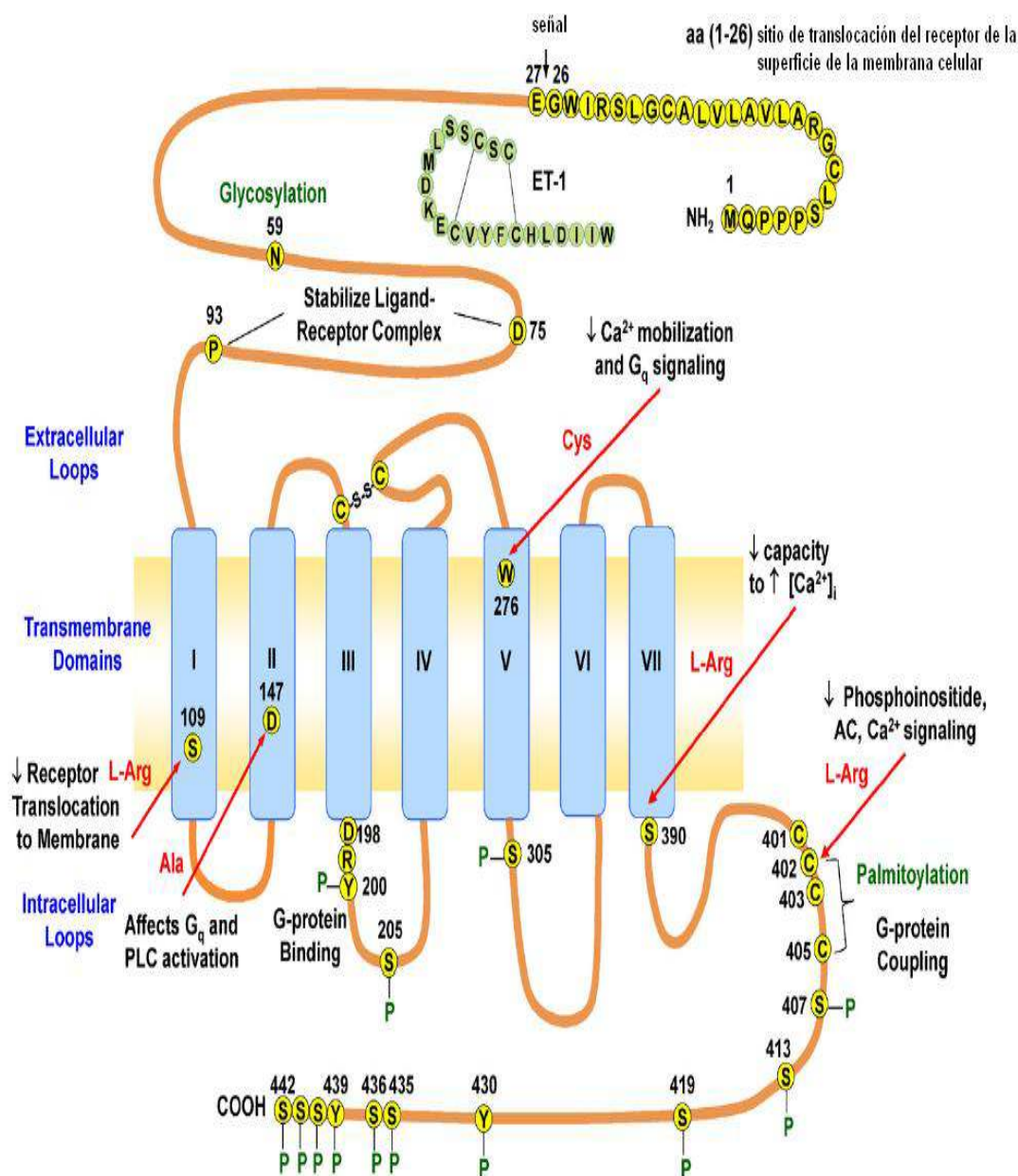


Figura 11: Estructura del Receptor de ETs humano ETB-R: El gráfico muestra algunos de los sitios que podrían afectar a la unión al receptor generando diferentes tipos de señalización, como fosforilación y glicosilación (Mazzuca y Khalil, 2012) AC Adenilato ciclasa Gq Proteína g P Palmioylación de membrana

La activación de PLA₂ por ETs induce la liberación de ácido araquidónico que se convierte entonces en prostaglandinas, leucotrienos y troboxano lo que sugiere que los metabolitos eicosanoides pueden mediar diversas funciones biológicas de las ETs. La producción de ácido araquidónico está mediada por la activación de PLA₂, así como por la estimulación indirecta PLC. La activación de PLA₂ directa implica mecanismos que conducen a un aumento de calcio intracelular que activan PLA₂ sensible al calcio, mientras que la estimulación PLC induce la producción de DAG que a través de lipasas daría lugar a la producción de ácido araquidónico. Tanto la PLC y la activación de PLA₂ por ETs se logra por vías separadas pero mediadas por los receptores ET_A y ET_B (Horinouchi y col., 2013).

Por otra parte, las ETs activan la fosfolipasa D (PLD) que hidroliza fosfolípidos, produciendo ácido fosfatídico, que libera colina y etanolamina (Sokolovsky, 1995, Hess, 2000, Horinouchi y col., 2013).

Además, el Ca²⁺ en asociación con calmodulina puede modular diversos procesos intracelulares o activar quinasas Ca²⁺-calmodulina dependientes como por ejemplo la proteína quinasa dependiente de Ca²⁺ calmodulina II (CaMKII) y proteínas tirosina quinasa produciendo diferentes efectos tales como la inducción de protooncogenes, activando la vía de MAPK y la síntesis de ADN (Clerk y col., 2002, Horinouchi y col., 2013). Por otro lado, el incremento de DAG induce la activación de la proteína quinasa C (PKC), la cual fosforila diversos sustratos y fosfolipasa D (PLD), que lleva a la hidrólisis de diferentes fosfolípidos (Sokolovsky y col., 1995, Robin y col, 2005; Horinouchi y col., 2013). El aumento de Ca²⁺ intracelular se puede deber a dos procesos distintos e independientes. El primer proceso depende de la rápida y transiente movilización de Ca²⁺ del retículo endoplasmático mediada por IP3 anteriormente descrita. Mientras que en el segundo proceso la activación de los receptores de ETs también produce un aumento del Ca²⁺ citosólico mediante dos procesos, uno se realiza a través del co-transportador de Na⁺/H⁺, y el otro por un aumento sostenido de la entrada de Ca²⁺ extracelular, que es el resultado de la activación de los canales voltaje y/o ligando dependientes. Este aumento produce la activación de las vías de las CaM-quinasas y la óxido nítrico sintasa (NOS), la activación de la misma produce GMPc que activa la proteína quinasa G (PKG). También se observó que el receptor ET_A y el ET_B estimulan (vía Gs) e inhiben (vía Gi), respectivamente, la acumulación de AMPc (Pérez-Alvarez y col., 2000; di

Nunzio y col., 2002; 2004, Hynynen y col., 2006; Zeng y col., 2006, Horinouchi y col., 2013, Boesen, 2015). De esta manera, el incremento de los niveles de AMPc puede en consecuencia estimular a la proteína quinasa A (PKA).

Asimismo, las ETs pueden incrementar o disminuir la producción de GMPc. Las ETs estimulan la producción de GMPc en cultivo de células híbridas de neuroblastoma y células de glioma y en cortes de cerebelo y eminencia media de rata (Reiser, 1990; Sharga-Levine y col., 1994). Varios autores demostraron que el incremento de GMPc producido por las ETs es mediado por la óxido nítrico sintasa (NOS). Asimismo, en la literatura actual existe evidencia contundente que el receptor ET_B se encuentra acoplado a la vía del óxido nítrico (NO) (Hirata y col., 1993; Owada y col., 1994; di Nunzio y col., 2002; Mathison y col., 2002; Jaureguiberry y col., 2004; Rossi y col., 2006, Horinouchi y col., 2013, Böesen, 2015).

En el SNC, el NO puede ser sintetizado bajo ciertas condiciones a partir de la L-arginina por dos isoformas de NOS (Mathison y col., 2007), la NOS neuronal (nNOS), expresada en una población discreta de neuronas (Bredt y col., 1991; Schuman y col., 1994, Watts y col., 2013) y por la NOS endotelial (eNOS), expresada en el endotelio de la microvasculatura del cerebro y en las células epiteliales del plexo coroideo (Seidel y col., 1997) como así también en una población de neuronas (Dinerman y col., 1994). El NO se une subsecuentemente al grupo hemo de la guanilato ciclasa soluble, activándola e incrementando los niveles de GMPc y este a su vez aumentando la actividad la proteína quinasa G (PKG) (Bredt y col., 1991).

Por otra parte, las ETs pueden activar el intercambiador Na⁺/H⁺ en diferentes tejidos y tipos de células incluyendo células del músculo liso vascular, células endoteliales de los capilares del cerebro, células de diferentes regiones del SNC, células del túbulo proximal renal y del riñón, induciendo una alcalinización intracelular (Battistini y col., 1991; Garrido e Israel, 2004, Böesen, 2015).

Como puede observarse, los mecanismos intracelulares que desencadenan la unión de las ETs a sus receptores es sumamente compleja y variada dependiendo de una gran cantidad de factores y variables que sumadas producen los variados efectos biológicos de estos péptidos.

Parte de lo descripto previamente se esquematiza en la Figura 12.

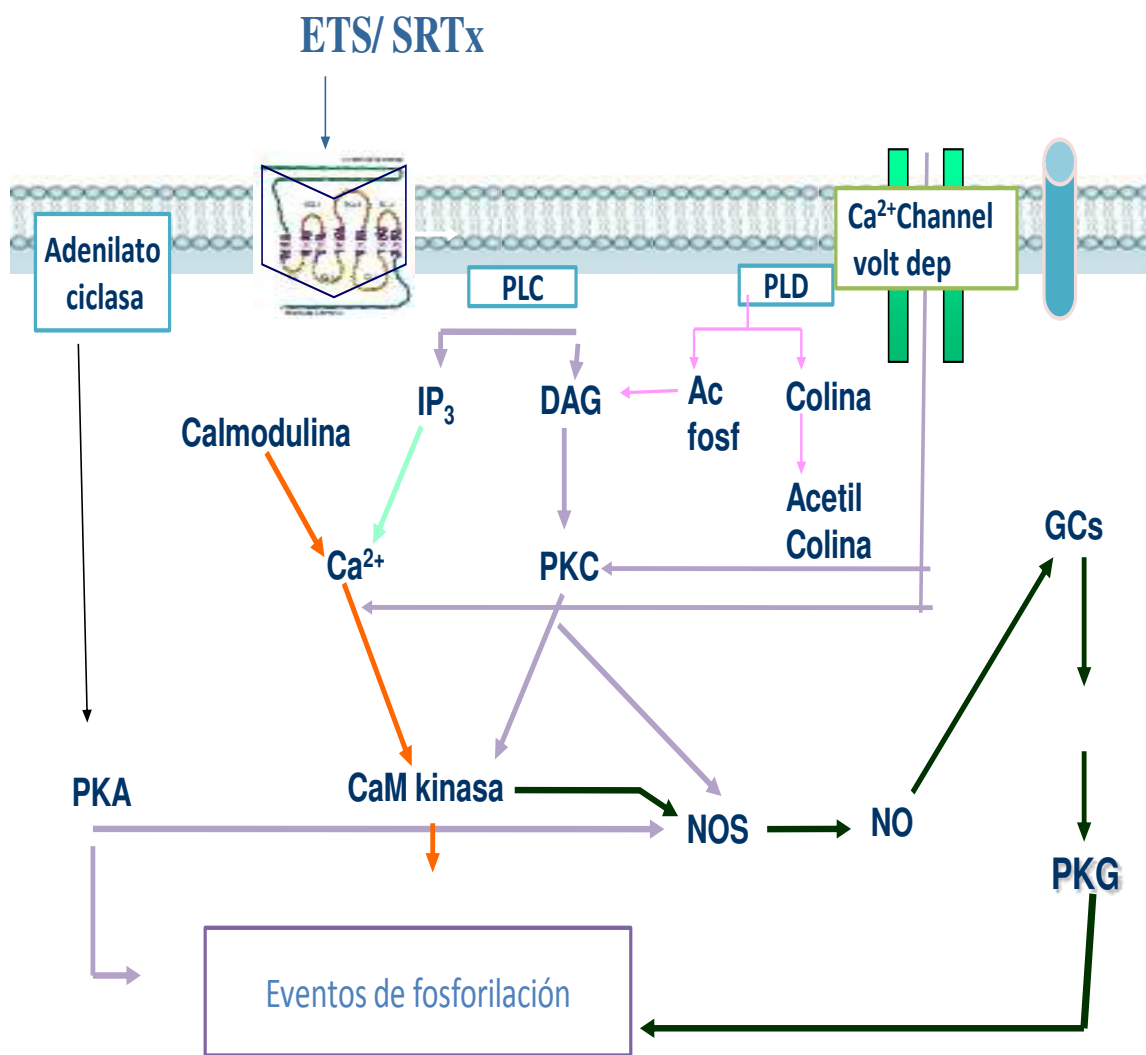


Figura 12: Esquema que representa las diferentes vías intracelulares involucradas en la activación de los receptores de ETs que inicialmente por la interacción con la Proteína G activan segundos mensajeros con la activación de las múltiples isoformas de proteincinasas (PKC, PKA, PKG), fosfolipasas (PLC y PLD) para producir eventos de fosforilación IP₃: inositol trifosfato, DAG: diacilglicerol, GS: Guanilato ciclasa soluble, CaMKII: Ca²⁺/Calmodulina Proteína Kinasa II. . (modificado de Lee y col. 2014)

1.3.5- Acciones Biológicas

Las ETs regulan múltiples funciones biológicas tanto en condiciones fisiológicas como en fisiopatológicas. Éstos péptidos presentan acciones fundamentalmente parácrinas y autócrina, además de tener funciones como neuropéptidos (*Vatta y col., 2009, Khimji y Rockey, 2010, Rautureau y Schiffrin, 2012, Mazzuca y Khalil, 2012, Böesen, 2015, Vatta y col.; 2015*).

A continuación analizaremos algunas de sus acciones específicas:

- Acciones de las ETs sobre el sistema nervioso

La expresión de los genes de las ETs, la ET-inmunoreactiva, sus receptores y las ECE están distribuidos en amplias regiones y áreas del SNC demostrando que existe biosíntesis local a nivel del SNC, además de que estos péptidos están involucrados en la regulación de una gran variedad de acciones biológicas controladas a nivel central (*Stojilkovic y Catt, 1996; Kuwaki y col., 1997; Kurokawa y col., 2000; Vatta y col., 2009, Vatta y col.; 2015*). Diversos trabajos muestran que las ETs poseen efectos regulatorios centrales sobre las funciones cardiovascular y renal, así como también sobre la síntesis y liberación de varias hormonas y neurohormonas (vasopresina, renina, angiotensina II, aldosterona, FSH, LH, LH-RH, hormona del crecimiento, prolactina) (*Rubanyi., 1995; Stojilkovic y Catt, 1996; Kuwaki y col., 1997; Rossi y col., 2002; 2006*).

La presencia de los receptores de ETs en la médula ventrolateral rostral de rata que es una región del centro vasomotor íntimamente relacionada con la regulación de la presión arterial, sugieren inequívocamente que estos péptidos juegan un papel trascendental en la regulación central de la función cardiovascular (*Kuwaki y col., 1997; Vatta y col., 2009*). Asimismo, se describieron los receptores de ETs en tálamo, hipotálamo, striatum, hipocampo, corteza cerebral, cerebelo, bulbo olfatorio y médula espinal entre otras regiones centrales (*Kuwaki y col., 1997; 1999; Yamamoto y col., 1998; Gebke y col., 2000*). La presencia de un ETs en las áreas mencionadas sugiere que estos péptidos participan en el control sensoriomotor del organismo (*Kuwaki y col., 1997; 1999*).

Por otra parte, Siren y Feuerstein, (1989), observaron que la administración intracerebroventricular de ET-1 produce una importante respuesta presora. Asimismo, se observó

que la administración de ET-1 en el ventrículo lateral de ratas y conejos así como en el área postrema de ratas anestesiadas produce un importante incremento de la presión arterial (*Rubayani, 1995; Haynes y Webb, 1998, Yamamoto y col., 1998*). Además, varios trabajos mostraron que cuando ET-1 es aplicada a nivel central se produce un aumento de los niveles plasmáticos de CAs y arginina-vasopresina como así también un incremento de la actividad simpática renal (*Kawano y col., 1989; Yamamoto y col., 1998*). Los efectos cardiovasculares de la administración central de ETs se atribuyen a cambios en la descarga simpática ya que se observó la pérdida de dichos efectos cuando se realiza un bloqueo ganglionar pero no cuando se administra antagonistas de los receptores de angiotensina II o vasopresina (*Kuwaki y col., 1999*). Más aún, la respuesta presora observada luego de la administración intracerebroventricular de ET-1 en ratas y en conejos no solo es eliminada por bloqueantes ganglionares sino también por antagonistas $\alpha 1$ -adrenérgicos (*Matsumura y col. 1991; Ono y col., 1995; Yamamoto y col., 1998*).

Por otra parte, la inyección de ET-3 en el tercer ventrículo, induce una respuesta inhibitoria sobre la ingesta de agua en ratas, sugiriendo que las ETs regulan centralmente la homeostasis hidrosalina (*Gasic y col., 1992*). Además, la administración intracerebroventricular de ET-3 produce un marcado aumento tanto de la presión arterial como de la excreción urinaria de NA, Ad y vasopresina (*King y col., 1995; Levin, 1995; Rubanyi., 1995; Haynes y Webb, 1998*). Por su parte, *Mosqueda- García y col. (1995)*, observaron que la inyección de bajas dosis de ET-3 en el núcleo del tracto solitario produce un aumento de la presión arterial y la frecuencia cardíaca.

Distintos estudios apoyan fuertemente que las ETs pueden actuar en el SNC como neurotransmisores putativos o neuropéptidos reguladores (*Mosqueda- García y col. 1995; Yamada y col., 1999; di Nunzio y col., 2002, 2004; Perfume y col., 2007, 2008;; Nabhen y col., 2009, 2010*). Se sabe que las ETs a través de la liberación de monoaminas a nivel de las terminales nerviosas activarían el sistema renina-angiotensina y posiblemente la vía monoaminérgica, lo que mediarían las respuestas centrales de estos péptidos (*Oparil y col., 1995; Yamada y col., 1999*). Asimismo, las ETs estimulan la liberación de CAs en corteza cerebral y además aumentan la Ca^{2+} intracelular en hipocampo de rata (*King y col., 1995; Oparil y col., 1995; Yamada y col., 1999*). En células adrenales cromafines, las ETs incrementan la liberación de NA activando dos tipos de canales de Ca^{2+} voltaje independientes (NSCC-1 y NSCC-2) así como también la apertura de los

canales de tipo L voltaje dependiente (*Stojilkovic y Catt, 1996*). Por otro lado, la DA es el neurotransmisor dentro del SNC más estudiado relacionado con los efectos de las ETs sobre la neurotransmisión. Webber y col., (1998), observaron que ET-1 induce la liberación de DA en el cuerpo estriado de rata a través del receptor ET_B. Asimismo, Webber y van de Buuse, (2000), describieron la interacción ETs-DA en la isquemia cerebral, la función neuroendócrina así como también en el comportamiento. Por otra parte, las ETs aumentan la secreción de sustancia P en el hipotálamo y la adenohipófisis (*Calvo y col., 1990*).

Como fuera comentado previamente, nuestro grupo de trabajo está abocado al estudio de la interacción entre el sistema endotelinérgico y la transmisión noradrenérgica en el SNC y su posible relación con la hipertensión arterial experimental. Es así que en diversos trabajos demostramos que tanto la ET-1 y ET-3 modulan la liberación neuronal de NA tanto en HA como en el HP y en los bulbos olfatorios. Estos efectos eran mediados por diferentes receptores y vías intracelulares dependiendo del área estudiada (*di Nunzio y col., 2002; 2004; Nabhen y col., 2009, 2010*). Por otra parte, también describimos que estos péptidos regulan de manera diferencial la actividad y expresión de la enzima limitante del proceso de biosíntesis de la NA, la tirosina hidroxilasa (*Morgazo y col., 2005; Perfume y col., 2007, 2008;; Nabhen y col., 2009, 2010*). En este sentido demostramos que las variaciones en la regulación de la tirosina hidroxilasa por ETs no solo se debían a la región del SNC estudiada, sino que también a los tiempos de exposición.

En trabajos realizados en animales hipertensos DOCA-sal se observó alteraciones del sistema catecolaminérgicos y modificaciones en la modulación producida por el sistema endotelinérgico. Además encontramos una asimetría funcional del sistema catecolaminérgicos entre las hemiporciones derecha e izquierda del HA de ratas DOCA-Sal. Así en el HA derecho (estructura simpático inhibitoria) de animales DOCA-Sal, la transmisión noradrenérgica se encuentra disminuida. Por otra parte, en estos animales el tratamiento “*ex vivo*” con ET-1 y ET-3 tiene una respuesta contraria al obtenido para normotensos a nivel de la síntesis de CAs. Se observa que hay un aumento en la actividad de TH, por aumento de las formas fosforiladas de la enzima, sin que este aumento se refleje en una mayor liberación, sino por el contrario hay menos liberación y captación de NA que en ausencia de los tejidos incubados con ETs (*Abramoff y col, 2013; Abramoff y col., 2015*).

Por otra parte, en el HP y en los bulbos olfatorios de animales DOCA-Sal, el sistema catecolaminérgico presenta una mayor síntesis y liberación neuronal de NA, sugiriendo que estas estructuras se comportan como un centros simpático excitatorios (Abramoff y col, 2013; Abramoff y col., 2015). También a nivel de los bulbos olfatorios, encontramos asimetría en la modulación de la síntesis de CAs por ETs exógenas. Mientras que en animales normotensos, ambos bulbos olfatorios responden al tratamiento con ETs aumentando la síntesis y liberación de NA; en animales DOCA-Sal y sólo en el bulbo derecho, el tratamiento con ETs produce una mayor recaptación y una menor liberación de NA, sugiriendo que en bulbo olfatorio las ETs producen un efecto inhibitorio en la activación del sistema catecolaminérgicos. Así, aparte de la existencia de una asimetría funcional, el tratamiento con ETs produce respuestas asimétricas en estas estructuras (Abramoff y col, 2013; Abramoff y col., 2015).

Acciones de las ETs sobre el sistema cardiovascular

Desde sus inicios se describió los efectos biológicos de las ETs sobre el sistema cardiovascular. Así se demostró que la infusión intravenosa o intraarterial de ETs produce una transiente vasodilatación seguida de una marcada vasoconstricción (Haynes y Webb, 1998, Rautureau y Schiffrin, 2012, Mazzuca y Khalil, 2012).

Respecto a los efectos cardíacos propiamente dicho, se comprobó que las ETs producen efectos inotrópicos positivo sobre el corazón, en tanto que los efectos cronotrópicos no son del todo claros (Gössl y Lerman, 2008, Rautureau y Schiffrin, 2012). La ET-1 induce, además, una potente y sostenida contracción en las células del músculo liso vascular (Gössl y Lerman, 2008). Las ETs ejercen sus acciones cardíacas debido a la presencia de receptores específicos para las mismas en miocitos y en el nódulo auriculoventricular (Yamasaki y col., 1989 Ishikawa y col., 1989; Gu y col., 1990; 1997; Karwatowska-Prokopczuk y col., 1990; Hirata y col., 1993). Además, estos péptidos incrementan la duración del potencial de acción (Watanabe y col., 1989) e inducen una marcada vasoconstricción coronaria (Clozel y Clozel, 1989).

Distintos autores demostraron que la inyección in bolus de ET-1 produce una respuesta bifásica sobre la PA, primero disminuye la PA, posiblemente debido a un incremento del factor de relajación endotelial, y en segundo término produce un incremento de la PA sistémica debido a

un efecto directo e indirecto (por incremento de la actividad simpática) (Nayler y col., 1989; 1990; Knuepfer y col., 1989). De esta manera, se propuso que la respuesta inicial depresora se produce por la estimulación del receptor ET_B acoplado a la liberación de sustancias dilatadoras del endotelio como el NO, mientras que la respuesta presora es mediada por el receptor ET_A en las células musculares lisas (King y col., 1995; Levin, 1995; Rubanyi., 1995; Haynes y Webb, 1998). Sin embargo, varios trabajos sustentan que la respuesta vasoconstrictora de estos péptidos también involucra la activación del receptor ET_B presente en las células musculares lisas vasculares (Clozel y Clozel, 1989; Rubanyi., 1995, Mazzuca y Khalil, 2012).

Acciones de las ETs sobre el sistema renal

Las ETs producen sobre el riñón no sólo son acciones hemodinámicas, sino que también ejercen efectos directos sobre la función renal, siendo ambos ejercidos de manera parácrina y autócrina (Pollock, 2000, Kohan y col., 2011, Speed y Pollock, 2013, Boesen, 2015).

Se comprobó mediante inmunohistoquímica y la expresión del ARNm que el riñón es un tejido donde se sintetizan y secretan ETs. Los riñones humanos no sólo tienen la capacidad de producir ET-1, sino que contienen una alta concentración de ambos subtipos de receptores en las diferentes porciones de la neurona (Kohan y col., 2011, Speed y Pollock, 2013, Boesen, 2015).

Debido a su potente acción vasoconstrictora las ETs son consideradas como péptidos de importante acción sobre la regulación del tono vascular (Pollock, 2000; Kohan y col., 2011, Speed y Pollock, 2013). De esta manera, la administración intravenosa de las ETs produce una severa vasoconstricción que es dosis-dependiente, que luego es precedida de una leve vasodilatación en la arteria renal (Chou y col., 1995; Naicker y col., 2001, Evans, 2008). Ésta última respuesta vasodilatadora es mediada por el receptor ET_B acoplado a la producción de NO y a la liberación de prostaglandinas (Chou y col., 1995), mientras que el efecto vasoconstrictor se produce por la activación del receptor ET_A acoplado a la apertura de los canales de Ca²⁺ (Naicker y col., 2001; Evans, 2008).

King y col (1995) demostraron que la inyección intravenosa de ETs disminuye tanto el flujo plasmático como la tasa de filtración glomerular de manera dosis dependiente. Tanto la ET-1 como la ET-3 inducen, en dosis moderadas, una reducción significativamente mayor del flujo renal

plasmático con respecto a la tasa de filtración glomerular llevando a un incremento de la fracción de filtración renal (King y col., 1995;). Sin embargo, dosis elevadas producen reducciones paralelas tanto en el flujo renal plasmático como en la tasa de filtración glomerular (King y col., 1995).

El receptor ET_B media todos los efectos de las ETs sobre los parámetros hemodinámicos renales, en especial la vasodilatación de la médula renal (Watts S, 2010, Mazzuca y Khalil, 2012, Speed y Pollock, 2013, Boesen, 2015).

Una forma importante de control de la hemodinamia y la presión es a través de sus efectos sobre la excreción de Na⁺ y agua, por lo que, en el riñón sano, tendría efectos diuréticos y natriuréticos, mediados principalmente por los receptores ET_B. (Speed y Pollock, 2013).

Otros efectos biológicos de las ETs.

Como se describió previamente, las ETs están involucradas en el control hipotalámico de la neurosecreción, el balance hidrosalino y la presión arterial. ET-inmunoreactiva, ARNm-ET y sitios de unión se expresan en distintos regiones del sistema hipotálamo-hipofisario (Yamamoto y col., 1998; Mac Cumber y col., 1989). Las ETs también actúan a nivel de la glándula adrenal. Así se demostró que estos péptidos estimulan la síntesis y la secreción de corticosterona y de prostaglandinas en la zona fascicular y reticular de la glándula adrenal a través de la activación del receptor ET_B (Rossi y col., 2002; 2006, Yamada y col., 1999). Por otro lado, las ETs inducen la liberación de aldosterona de forma dosis dependiente desde las células glomerulosas adrenales a través del receptor ET_B e involucra la vía de los fosfoinosítidos y procesos Ca²⁺- calmodulina dependiente (Rebuffat y col., 2000; Andreis y col., 2002).

Asimismo, las ETs estimulan la secreción de gonadotropinas, hormona de crecimiento, hormona estimulante de la tiroides y prolactina de la adenohipófisis. La liberación de gonadotropinas inducida por ETs involucra la activación del receptor ET_A acoplado a la vía de los fosfoinosítidos (Stojilkovic y Catt, 1996). Además, estos péptidos incrementan la liberación de oxitocina y vasopresina de la neurohipófisis (Matsumura y col. 2000; Yamamoto y col., 1998; Rossi y col., 2002; 2006). La liberación de vasopresina inducida por ETs es mediada por el receptor ET_B (Rossi y col., 2002, 2006).

En la médula adrenal, la ET-1 estimula la síntesis y liberación de CAs activando canales de Ca^{2+} voltaje dependiente de tipo L (*Belloni y col., 1997; Lee y col., 2007*). La respuesta inducida por ETs en la médula adrenal involucra los dos tipos receptores clásicos en ratas (*Belloni y col., 1997*) mientras que en bovinos implica al receptor ET_A (*Lee y col., 2007*). A pesar de que en perros, los efectos de estos péptidos son principalmente mediados vía el receptor ET_A , no se puede descartar la participación del receptor ET_B (*Yamaguchi, 1997*). Además, en células PC12 la ET-1 estimula síntesis de CAs a través del receptor ET_A acoplado a la vía de la PLC/PKC (*Takekoshi y col., 2002*).

Las ETs aumentan la actividad de la enzima convertidora de angiotensina en células musculares aórticas (*Moroi y col., 1996*) e incrementan la expresión de protooncogenes como c-myc, c-fos y c-jun en la musculatura lisa vascular (*Rossi y col., 2002; 2006*). Estos péptidos no solo estimulan la proliferación de células musculares vasculares sino también de células musculares respiratorias, miométriales y prostáticas (*Saita y col., 1998, Rodriguez y col., 2005; 2006*). Las ETs también promueven la proliferación de fibroblastos alveolares, cardíacos y epidérmicos (*Fujisaki y col., 1999; Piancentini y col., 2000*).

Luego de la administración central o periférica, las ETs también ejercen efectos biológicos en el sistema digestivo, particularmente en el hígado (*Kuwaki y col., 1997; Rodriguez y col., 2005; 2006*). En trabajos realizados en colaboración con el grupo de la Dra. Bianciotti demostramos que tanto las ETs como sus receptores se expresan en el complejo dorsal del vago, el cual es el sitio de mayor regulación de la función gastrointestinal. Varios estudios muestran que ambas ETs participan de la regulación central de la secreción biliar (*Rodriguez y col., 2005*). La administración central de ET-1 induce un efecto colerético o colestático dependiendo de la dosis aplicada, involucrando al receptor ET_A y a la vía vagal (*Rodriguez y col., 2006*). Asimismo, ET-1 produce un incremento de la motilidad gástrica a través de la misma vía y mismo receptor (*Krowicki y col., 1997*). Además, la ET-3 también induce una respuesta opuesta sobre la secreción biliar dependiendo de la dosis aplicada, involucrando tanto al receptor ET_A como al ET_B y a la vía del NO (*Rodriguez y col., 2005*). Por otra parte, la administración de ET-1 induce un incremento de la presión venosa portal a través del receptor ET_A acoplado al aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular (*Tanaka y col., 2007*).

Por lo anteriormente descrito, se desprende que las ETs están involucradas en una amplia y variada gama de acciones biológicas y el importante papel de estos péptidos tienen tanto en la fisiología como en diferentes procesos fisiopatológicos entre las que se destacan las alteraciones cardiovasculares.

2- Hipótesis y objetivos

Es ampliamente conocido que la NA y las ETs juegan de manera individual papeles trascendentales en la regulación y control de la fisiología cardio-circulatoria, tanto a nivel periférico como central. También se sabe que las CAs modulan a corto y a largo plazo la presión arterial, siendo los mecanismos involucrados diferentes y en muchos casos poco claros aún (Harris y Zhang, 2013; Huang and col., 2013).

En resumen y teniendo en cuenta que:

- ✓ Existe expresión de ETs en neuronas catecolaminérgicas hipotalámicas.
- ✓ El hipotálamo es un centro integrador y regulador de distintas funciones entre ellas la cardiovascular.
- ✓ El HA es conocido como una región simpatoinhibitoria y el HP como una región simpatoexcitatoria.
- ✓ En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio demostramos que las ETs modulan la liberación y biosíntesis de NA de manera diferencial tanto en el HA como en el HP de animales normotensos e hipertensos.
- ✓ La captación neuronal de NA es el mecanismo más importante mediante el cual se regula la concentración de la amina en el espacio sináptico movilizándolo el neurotransmisor hacia la terminal presináptica. Por lo tanto, este mecanismo provee una fina regulación que es la responsable de la terminación del efecto de la NA.

Formulamos la siguiente hipótesis de trabajo, sobre la base de éstos antecedentes:

“Las ETs actúan como neuropéptidos moduladores de la transmisión noradrenérgica hipotalámica, regulando los diversos pasos de la misma, en este caso, modulando la actividad del NET”.

Por lo anteriormente expuesto, y con el objeto de responder la hipótesis planteada, el presente trabajo de Tesis Doctoral tiene como **objetivo principal** estudiar las acciones de las ETs (ET-1 y ET-3) sobre la captación de NA, los receptores endotelinérgicos involucrados y mecanismos intracelulares que regulan esta interacción. De esta manera, se podría explicar, en parte, los mecanismos que gobiernan la interacción entre el sistema endotelinérgico central y la

transmisión noradrenérgica a nivel de diferentes áreas y regiones del SNC, en este caso en particular en el HA e HP de ratas normotensas.

Este estudio se realiza en diferentes regiones hipotalámicas debido a que es un centro regulador y en particular el HA presenta componentes importantes de la vía del barorreflejo que regulan la presión arterial. Fundamenta esta afirmación lo observado en algunas formas de hipertensión espontánea en las que se redujo la señal barorrefleja en esta zona hipotalámica (Calaresu y col., 1980; Oparil y col., 1995; Dampney y col., 2005). Por su parte, el HP porque que fisiológicamente corresponde a una región simpato excitatoria. Se comprobó ésta función cuando mediante la estimulación eléctrica de las neuronas del HP, se incrementó la actividad del sistema nervioso simpático y de ésta manera se atenuó la bradicardia y se produjo un incremento de la presión arterial (Saper y col., 1976; Oparil y col., 1995; Vertes y Crane, 1996).

Trabajamos con las ETs y la relacionamos con la actividad noradrenérgica ya que se observó que la inyección “*in bolus*” de ET-1 produce una respuesta bifásica sobre la presión arterial. Primero, se observa una disminución transitoria de la presión debido a la liberación de NO y luego, un incremento sostenido como resultado de la acción directa de las ETs como así también indirecta por estimulación de la actividad simpática (Kuwaki y col., 1999; 1997; Gulati y col., 1997, Davenport y col., 2006). Además, sólo se estudiaron las isoformas ET-1 y la ET-3 debido a su elevada expresión dentro del SNC y que varios autores demostraron que ambos péptidos regulan diferentes pasos de la transmisión catecolaminérgica en distintas áreas del SNC, *aunque todavía no se conoce como actúa sobre un mecanismo trascendental de este proceso como es la captación de la NA* (Koizumi y col., 1992; King, 1995; Oparil y col., 1995; Yamada y col., 1998; Carlson y col., 2001; Webber y van den Buuse, 2000; Wyss y col., 2001, di Nunzio y col, 2004; Perfume y col., 2007, 2008;; Nabhen y col., 2009, 2011; Abramoff y col., 2013).

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se estudia la actividad del NET ya que constituye el mecanismo más importantes que permite regular la disposición del neurotransmisor en el espacio sináptico (Eisenhofer, 2001; Blakely, 2005; Mandela y Ordway, 2006; Ramamoorthy y col., 2011). Debido a su relevancia en la fisiología de la neurotransmisión noradrenérgica, se la puede regular a través de diversas sustancias neuromoduladoras como angiotensina, péptidos natriuréticos, bradiquinina y otros péptidos neuromoduladoras.

Por lo tanto y con el objeto de demostrar la hipótesis planteada se propuso realizar los siguientes estudios:

- Estudio de la actividad del NET:

1. Determinación de los efectos de ET-1 y -3 sobre la captación de NA.

- Efectos de distintas concentración de ET-1 y ET-3 sobre la captación total de la NA.
- Definición de los efectos de las ETs sobre la captación neuronal y/o extraneuronal de la NA.
- Determinación de los efectos de las ETs a diferentes tiempos.

2. Determinación de los efectos de las ETs sobre la cinética del NET.

- Se determinará las siguientes constantes cinéticas: Km y Vmax.

3. Definir los receptores endotelinérgicos involucrados.

- Determinación, mediante la utilización de antagonistas y agonistas, el y/o los receptores de ETs involucrados.

4. Determinación de los mecanismos intracelulares involucrados.

- Vía del Óxido Nítrico.
- Vía de los Fosfoinosítidos.
- Vía del AMPc/PKA.
- Participación del calcio.

- Estudio del mecanismo de internalización del NET:

1. Estudio de los efectos de las ETs sobre la unión de Nisoxetina.

2. Determinación de los mecanismos intracelulares involucrados.

- Vía del Óxido Nítrico.
- Vía de los Fosfoinosítidos.
- Vía del AMPc/PKA.
- Vía de la CAM KII.

3- Materiales y métodos

3.1- Animales.

En todos los experimentos realizados en la presente tesis se utilizaron ratas machos de la cepa Sprague-Dawley cuyo peso osciló entre los 300 y 350 gramos, proveniente del Bioterio Central de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA. Éstos animales se mantuvieron en una sala perteneciente al Bioterio de la Cátedra de Fisiología (IQUIMEFA-CONICET) con temperatura (21-23°C), humedad (45-55%) y ciclos de luz/obscuridad (12 hs c/u) controlados y se les proporcionó alimento balanceado y agua ad libitum. Cabe aclarar que el Bioterio se encuentra bajo el cuidado de personal Técnico especializado.

3.2- Drogas y reactivos.

Para los experimentos se utilizaron las siguientes drogas: L- [7,8-³H]-NA (362.75 GBq /mmol de actividad específica), L-[N- metil- ³H] nisoxetina HCl ([³H]-NSX, 3163.50 GBq /mmol de actividad específica) ambos provenientes de Perkin Elmer Life Science Inc., MA, USA; ET-1, ET-3, BQ-610 y BQ-788 (American Peptide, CA, USA); DMI HCL , GF-109203X, H-89, hidrocortisona (HC), pargilina (PG), suramina (SMN), (MP Biomedicals Inc., OH, USA); 2-APB, Safarotoxina S6b (SRTx-b), IRL1620 (Calbiochem, La Jolla, CA, USA); U73122, N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), azul de metileno (MeB) (Sigma Co., St Louis, MO, USA); KT5823 (Alomone Labs, Jerusalem, Israel) y el bitartrato de NA, que fue cedido generosamente por Laboratorios Richet SA (Argentina). Todas las drogas se disolvieron en solución de Krebs excepto por el 2-APB, H-89, GF-109203X y U73122 que se disolvieron en dimetil sulfoxido, la [³H]-NA en ácido acético 0.25 N y el IRL-1620 en NH₄OH 2.5%. Estos vehículos no modificaron la captación de NA y las respuestas de las ETs se mantuvo en presencia del dimetil sulfoxido (resultados no mostrados). Todas las drogas y reactivos que se utilizaron son de calidad analítica.

La solución de Krebs Ringer bicarbonato (KRB) tiene la siguiente composición: NaCl 118 mM, KCl 4.7 mM, MgCl₂ 1.2 mM, NaH₂PO₄ 1 mM, CaCl₂ 2.5 mM, EDTA-Na 0.004 mM, dextrosa 11.1 mM, NaHCO₃ 25 mM, ácido ascórbico 0.11 mM.

En los experimentos libres de sodio, los tejidos se incubaron con una solución Locke Standard (controles) (NaCl 154mM, KCl 2.6mM, MgCl₂ 1,2mM, KH₂CO₃ 0.85mM, CaCl₂ 2.2mM, y dextrosa 10mM, K₂HPO₄ 2.15mM) y una solución Locke libre de sodio (con la misma composición excepto que el NaCl fue reemplazado por el equivalente osmótico de sacarosa).

Ambos medios fueron burbujeados constantemente con carbógeno (95% O₂ / 5% CO₂) y mantenidos a un pH de 7.4 mediante un monitoréo constante.

3.3- Protocolos experimentales.

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con el manual de Cuidados y usos de animales de laboratorio (NIH Publication N° 85-2, 1985, revisado en 1996). En el presente trabajo se realizaron los mayores esfuerzos para utilizar el menor número posible de animales en cada experimento.

Las ratas se sacrificaron por decapitación entre las 9:00 y 12:00 a.m. con el objetivo de evitar las variaciones circadianas de las catecolaminas (Zigmond y col.; 1970). Inmediatamente se les extrajeron el cerebro en frío y se disecaron el HA y HP según el atlas de microdisección de Palkovits y Brownstein (1988). Todos los experimentos se realizaron *ex vivo*.

Los tejidos fueron incubados según los protocolos correspondientes a cada objetivo a estudiar y que son descriptos a continuación.

3.3.1- Estudio de la actividad del NET

3.3.1.1- Determinación de los efectos de ET-1 y -3 sobre la captación de NA

-Efectos de distintas concentraciones de ET-1 y ET-3 sobre la captación total de la NA.

Los tejidos se sometieron a diferentes pasos según la metodología ampliamente utilizada en nuestro laboratorio (Vatta y col., 1996) con modificaciones menores. Luego de su extracción los HA e HP y con el objeto de estabilizar los tejidos se realizó una preincubación a 37°C durante 30 minutos con 2 ml de KRB gaseada con carbógeno (95% O₂ / 5% CO₂) y pH 7.4 en baño tipo

Dubnoff. Inmediatamente, se incubaron durante 5 minutos con KRB adicionado con [^3H]-NA (2.5 $\mu\text{Ci/mL}$) en ausencia (controles) o en presencia de diferentes concentraciones de ET-1 o ET-3 (10, 100 pM y 1, 10, 100 nM).

Posteriormente los tejidos fueron sometidos a 3 lavados en frío (4°C) de 5 minutos cada uno. En todo momento los medios contenían 50 μM de Pargilina con el objeto de inhibir la actividad de la monoamino oxidasa. Por último los tejidos se homogenizaron con ácido tricloroacético al 5%, en frío y luego, fue centrifugado a 27.000 g durante 15 min. Del sobrenadante obtenido se determinó la actividad de la [^3H]NA por métodos convencionales de centellografía líquida utilizando el método del estándar externo (Wallac-WinSpectral 1414, Liquid Scintillation Counter) y del pellet se midieron las proteínas de acuerdo a *Lowry y col. (1951)*. Los resultados se expresaron como porcentaje respecto del control \pm SEM.

-Definición de los efectos de las ETs sobre la captación neuronal y/o extraneuronal de NA

Los HA e HP fueron sometidos a los mismos procedimientos experimentales que los descritos para la captación total de NA, excepto que los estudios de captación neuronal se realizaron en presencia de 10 μM de DMI, o en medios libres de Na^+ , o a 4°C (*Distelmaier y col., 2004*), mientras que los experimentos para determinar la captación extraneuronal los tejidos se incubaron con 100 μM de hidrocortisona. Los resultados se expresaron como porcentaje respecto del control \pm SEM.

-Determinación de la curva de captación de NA a diferentes tiempos

Para estos estudios los tejidos se sometieron a los mismos procedimientos que los descritos en captación total de NA, excepto que las incubaciones se realizaron a distintos tiempos (5, 10, 15, 30 y 60 minutos). Los resultados se expresaron como porcentaje respecto del control \pm SEM.

3.3.1.2- Determinación de los efectos de las ETs sobre la cinética del NET

Los HA e HP fueron sometidos a los mismos procedimientos experimentales que los descritos en la determinación de la captación neuronal de NA (*Vatta y col., 1996*). Sin embargo, en el período de incubación de 5 minutos los tejidos fueron expuestos a diluciones isotópicas de NA con concentraciones fijas de [³H]-NA (6nM) y se incrementaron las concentraciones de NA fría (10nM a 10μM). Las constantes cinéticas del transportador (Km y Vmax) se obtuvieron mediante el análisis de regresión no-lineal (*Bryan-Lluka y col., 2001; Distelmaier y col., 2004*). Los resultados se expresaron como captación neuronal de NA ± SEM (fmol/mg de proteína/minuto).

3.3.1.3- Definición de los receptores y vías intracelulares involucradas

Los tejidos se sometieron a los mismos protocolos que los descritos en la determinación de la captación neuronal de NA excepto que 15 minutos antes y durante los 5 minutos del período de incubación se adicionaron los siguientes antagonistas e inhibidores de los receptores y/o vías intracelulares según corresponda:

- ⇒ BQ-610 100nM (antagonista ET_A): *Juan y col., 2005; 2007; Kwok y col., 2007*.
- ⇒ BQ-788 100nM (antagonista ET_B): *Piuhola y col., 2003; Vierimaa y col., 2006*.
- ⇒ IRL-1620 1μM (agonista no selectivo ETA/ETB): *Yamada y col., 1999; D'Órleans-Juste y col., 2002*.
- ⇒ Sarafotoxina-6b (SRTx 6b) 300nM (agonista de receptores ET_A): aunque tiene la capacidad de activar ambos receptores (ET_A y ET_B). Si bien no es la herramienta ideal para estudios farmacológicos, es la única disponible debido a la falta de un agonista selectivo para dicho receptor. La concentración utilizada del agonista fue dentro del rango reportado en la literatura que muestran que SRTx-6b tiene un efecto similar al de ET-1 (*Bax y col., 1994; Bacon y Davenport, 1996*).
- ⇒ Suramina 500nM (inhibidor de proteína G): *Freissmuth y col., 1996; Holler y col., 1999*.
- ⇒ L-NAME 10 μM (inhibidor de la actividad de la óxido nítrico sintasa): *Yuan y col., 2003; Campos y col., 2006; Youssef y col., 2006*.

- ⇒ 7-NI 10 μ M (inhibidor de la actividad de la de la isoforma neuronal de la óxido nítrico sintasa): *Campos y col., 2006; Kim y col., 2006; Youssef y col., 2006.*
- ⇒ ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3,-a]quinoxalin-I-one) 10 μ M (inhibidor de la guanilato ciclasa oxido nítrico dependiente): *Teixeira y col., 2006; Lee y col., 2007.*
- ⇒ KT-5823 2 μ M (inhibidor de la PKG): *Yu y col., 2006; Anyadike y col., 2007; Prestifilippo y col., 2007.*
- ⇒ H-89 500nM (inhibidor de la PKA): *Lee y col., 2006; Qian y col., 2006; Szego y col., 2006.*
- ⇒ KN-62 1 μ M (inhibidor de la CaMK-II): *Tulapurkar y col., 2006; Vaymman y col., 2007.*
- ⇒ U 73122 10 μ M (inhibidor de PLC): *Carr y Surmeier, 2007; Lin y col., 2007.*
- ⇒ GF-109203x 100nM (inhibidor de la PKC): *Liu y col., 2008 ; Pendergrass y col., 2009 ; Wang y col., 2009.*
- ⇒ 2-APB 2 μ M (antagonista del receptor de IP3): *Bai y col., 2006; Tanaka y col., 2007; Ene y col., 2007.*
- ⇒ Dantrolene 50 μ M (antagonista de los receptores sensibles a rianodina); *Ari y col., 2009 ; Patel y col., 2009 ; Perderson y col., 2009.*
- ⇒ Chelerythrine 2mM (inhibidor de PKC): (Costa y col., 2005 ; Cuellar y col., 2005 ; Navarro-Lopez Ide y col., 2005 ; Zheng y col., 2005 ; Chung y col., 2006; Tanabe y col., 2006; ; Carr y Surmeier 2007)

En otro set de experimentos se incubaron los tejidos en presencia de los siguientes agonistas y/o análogos:

- ⇒ 8Br-cAMP 100 μ M (análogo del AMP_c): *Kostic y col., 2002; Naben y col, 2008, 2011; Wu y col.; 2013.*
- ⇒ 8Br-cGMP 100 μ M (análogo del CMP_c): *Murphy y Isaacson, 2003.; Sato y col., 2007, Naben y col, 2008, 2011; Wu y col.; 2013.*
- ⇒ Nitroprusiato de sodio 100 μ M (donador de óxido nítrico): *Naben y col, 2008; Naben y col, 2011; Wu y col.; 2013.*
- ⇒ Esteres de forbol (β PMA) 1 μ M (activador de PKC): *Kume y col., 2009; Naben y col, 2008, 2011; Wu y col.; 2013.*

⇒ Forskolina 20 μ M (activador de la adenilato ciclasa): *Kostic y col.*, 2002; Cho y col., 2008; *Naben y col*, 2008, 2011; *Wu y col.*; 2013.

Con el objetivo de evaluar la participación del Ca^{2+} en la captación neuronal de NA, se realizaron experimentos en los que los tejidos fueron incubados en un medio libre de calcio durante 5 minutos. El medio sin calcio tenía la misma composición que el KRB excepto que el CaCl_2 se reemplazó por el equivalente osmótico de sacarosa y se adicionó EGTA 0.1 mM como quelante del Ca^{2+} .

Todos los resultados correspondientes a estos estudios se expresaron como porcentaje respecto del control \pm SEM.

3.3.2- Estudio del mecanismo de internalización del NET

3.3.2.1- Estudio de los efectos de las ETs sobre la unión de Nisoxetina.

Los tejidos fueron tratados de forma similar a lo descrito previamente en la determinación de la captación total de NA excepto que en el período experimental de 5 minutos no se adicionó [^3H]-NA. Luego, los HA e HP se lavaron e incubaron con buffer de binding (NaCl 150mM, KCl 5mM y Tris 10mM) durante 2 hs a 4°C en presencia de diferentes concentraciones de [^3H]-NSX (0.1 – 5 nM). La unión no específica de NSX se determinó mediante la adición de DMI 10 μ M. Posteriormente, los tejidos se lavaron 3 veces con buffer frío y luego se homogenizaron en H_2O destilada seguido de la adición de Tritón X-100 (concentración final 0.1%). Las muestras se guardaron en frío durante 24 hs y luego fueron centrifugadas 27.000 g a 4°C durante 15 min y en el sobrenadante se determinó la actividad de [^3H]-NSX por técnicas convencionales de centellografía líquida utilizando el método del estándar externo (Wallac-WinSpectral 1414, Liquid Scintillation Counter). Las proteínas se midieron en el pellet de acuerdo al método de Lowry y col., (1951). Los datos se analizaron mediante el estudio de regresión no lineal obteniéndose la K_d y B_{max} (*Bryan-Lluka y col*, 2001, *Apparsundaram*, 2001). Los datos se expresaron como binding de [^3H]-NSX \pm SEM (pmol/mg de proteínas).

3.3.2.2- Determinación de los mecanismos intracelulares involucrados.

Los tejidos fueron sometidos a los mismos protocolos que los descritos en el protocolo para los estudios de receptores y vías intracelulares, excepto que en el período experimental (5 minutos) se omitió la [^3H]-NA. Los tejidos se lavaron e incubaron con un bufer de binding durante 2 hs. a 4°C en presencia de una concentración fija de [^3H]-NSX (0.5 nM). El binding inespecífico se determinó por la adición de DMI 10 μM . Luego los pasos siguientes son similares a los descritos en el protocolo anterior (*Estudio de los efectos de las ETs sobre el binding de Nisoxetina* [^3H]-NSX). En este estudio se utilizaron los siguientes inhibidores cuyos efectos y concentraciones ya fueran comentadas en el ítem “3.3.1.3- Definición de los receptores y vías intracelulares involucradas”:

:

- ⇒ 7-NI 10 μM ,
- ⇒ KT-5823 2 μM ,
- ⇒ H89 500nM,
- ⇒ GF-109203x 100nM,
- ⇒ KN-62 2 μM .

El tratamiento posterior de los HA e HP fueron similares a los descritos en el ítem anteriores así como también la expresión de resultados.

3.4- Análisis estadístico.

Los resultados se expresaron como la media \pm SEM. En el caso de los datos correspondientes a los estudios de captación total de NA, curva de captación de NA en función del tiempo, del análisis de la cinética del NET y del binding de NSX, se realizó el Test de Student. Para el resto de los estudios el análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando el “ANOVA” y el test de Student-Newman-Keuls (InStat, Graph Pad software, La Jolla, CA, USA). En todos los casos se consideró significativo valores de p menores de 0.05.

4- Resultados

4.1- Estudio de la actividad del NET

4.1.1- Determinación de los efectos de ET-1 y -3 sobre la captación de NA

- Efectos de distintas concentraciones de ET-1 y ET-3 sobre la captación total de NA.

Con el objetivo de determinar los posibles efectos de las ETs sobre la captación total de NA, en estos primeros experimentos se realizaron curvas concentración respuestas tanto en el HA como en el HP de ratas normotensas.

Para cumplir con este primer objetivo se utilizaron concentraciones crecientes de ET-1 y -3 y se realizaron, tanto para HA e HP, los siguientes grupos experimentales:

- ✓ Control
- ✓ ET-1 (10, 100 pM, y 1, 10, 100 nM).
- ✓ ET-3 (10, 100 pM, y 1, 10, 100 nM).

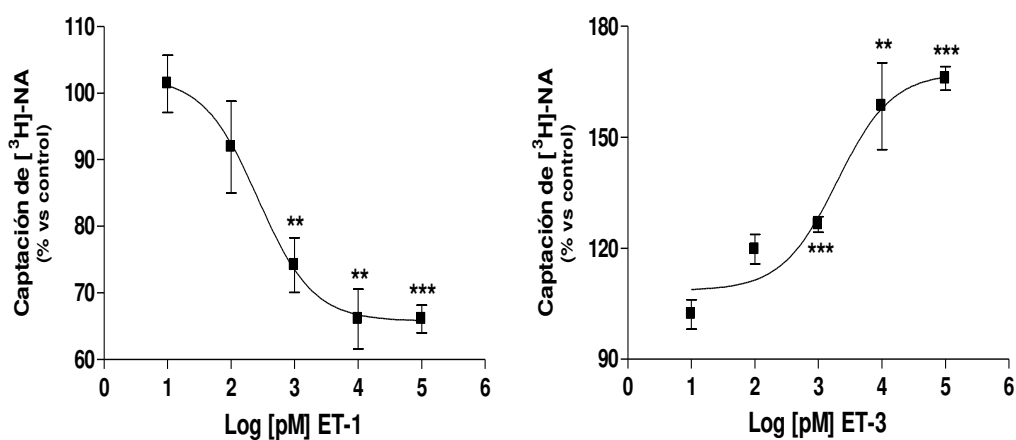
Si bien las curvas temporales de captación de NA que se realizaron posteriormente nos permiten determinar los tiempos correctos en donde se encuentra la pendiente correspondiente al proceso de captación, para estos primeros experimentos se eligió realizar las incubaciones durante 5 minutos debido a que este es un tiempo estándar en donde se observa el proceso de captación de NA (*Fernández y col., 1990, Vatta y col., 1996*).

Los resultados obtenidos en el presente experimento nos permiten observar que en el HA que la ET-1 1, 10 y 100 nM disminuyó la captación total de NA de manera concentración dependiente (Fig. 13). Sin embargo y por el contrario, la ET-3 1, 10 y 100 nM indujo un incremento sobre la captación total de NA, siendo dicho incremento también concentración dependiente (Fig. 13). En lo que respecta a las concentraciones 10 y 100 pM de las dos ETs estudiadas, no produjeron ningún efecto sobre este proceso (Fig. 13).

Por su parte, en el HP, los resultados demostraron que tanto la ET-1 como la ET-3 (100 pM. y 1, 10 y 100 nM) redujeron la captación total del NE, de una manera concentración

dependiente, sin observarse efecto alguno con 10 pM (Fig. 13). Sobre la base de los resultados obtenidos hasta el presente se eligió como concentración de trabajo 10 nM para ambas ETs.

HIPOTALAMO ANTERIOR



HIPOTALAMO POSTERIOR

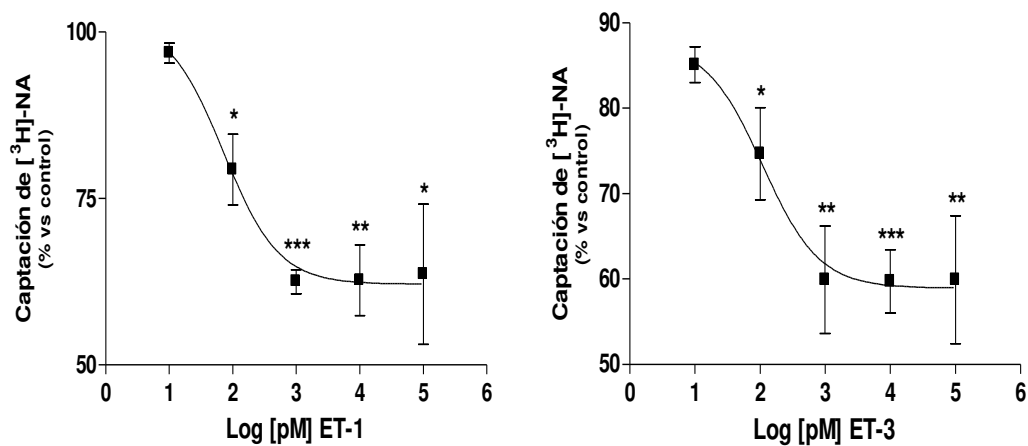


Figura 13: Efecto de diferentes concentraciones de ET-1 y ET-3 sobre la captación total de [³H]-NA en el hipotálamo anterior y posterior. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ vs Control. Los valores representan la media \pm SEM. Número de experimentos: 5-6.

- Definición de los efectos de las ETs sobre la captación neuronal y/o extraneuronal de NA

Con el objeto de dilucidar si los efectos producidos por las ETs sobre la captación total de NA son producto de su acción sobre el transportador neuronal (Captación o uptake 1) y/o el extraneuronal (Captación o uptake 2) se realizaron los protocolos descriptos previamente en materiales y métodos.

Para determinar si la variación de la captación es debida a la acción sobre los transportadores no neuronales se inhibió la captación neuronal de NA utilizando diferentes estrategias basadas en las características del NET. Se sabe que la captación neuronal es sensible a los antidepresivos triciclicos como la DMI, a la temperatura y al sodio (Mandela y Ordway, 2006; Reith y col, 2006; Torres y Amara., 2007). Teniendo en cuenta estas características, se realizaron incubaciones, en presencia de DMI 10 μ M, a bajas temperaturas (4°C) y con medio libre de sodio (SFM). Por otra parte, con el objeto de determinar si la variación de la captación es debida a la acción de transportador neuronal de NA (NET), la captación extraneuronal se inhibió con hidrocortisona (HC) 100 μ M (Mandela y Ordway, 2006; Reith y col, 2006; Torres y Amara., 2007; Vatta y col., 1992; 1993; 1996).

Para responder la incognita planteada en este punto se realizaron los siguientes grupos experimentales:

- Evaluación de la captación extraneuronal de NA

✓ Control	✓ Control	✓ Control
✓ DSM 10 μ M	✓ Control incubado a 4 °C	✓ Control incubado en SFM
✓ ET-1 10nM	✓ ET-1 10nM	✓ ET-1 10nM
✓ ET-3 10nM	✓ ET-3 10nM	✓ ET-3 10nM
✓ ET-1 + DMI	✓ ET-1 incubado a 4 °C	✓ ET-1 incubado en SFM
✓ ET-3 + DMI	✓ ET-3 incubado a 4 °C	✓ ET-3 incubado, en SFM

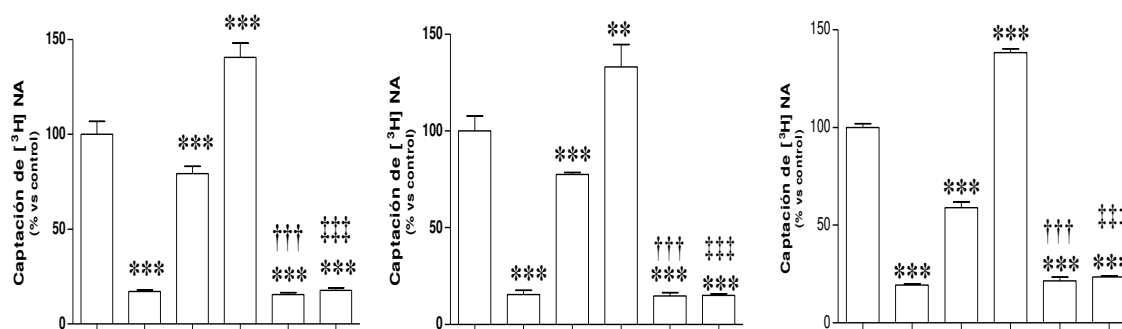
- Evaluación de la captación neuronal de NA

- ✓ Control
- ✓ Control + HC100 μ M
- ✓ ET-1 10nM
- ✓ ET-3 10nM
- ✓ ET-1 10nM + HC
- ✓ ET-3 10nM + HC

Los resultados mostraron que tanto en HA como en HP la inhibición de la captación neuronal utilizando los diferentes protocolos produjo una disminución significativa respecto de la captación total (controles) siendo la captación extraneuronal remanente de NA menos del 20% en todos los casos (Fig. 14). Además, se determinó que ambas ETs en el HA y el HP no modificaron la captación extraneuronal remanente de NA (Fig. 14).

En lo que respecta a los estudios sobre los efectos de las ETs sobre la captación neuronal de NA en el HA e HP, los resultados mostraron que la incubación de los tejidos con HC disminuye levemente la captación extraneuronal NA sin que esta sea significativa respecto del control (Captación total), dejando expuesta la captación neuronal remanente la que corresponde a aproximadamente al 80% de la total (Fig. 14). Cuando a los tejidos incubados con HC se les adiciona ET-1 10nM o ET-3 10nM, los efectos que producían estos péptidos sobre la captación total de NA tanto en el HA como en el HP son completamente inhibidos (Fig. 15). Estos resultados demuestran claramente que los efectos observados sobre la captación total de NA por las ETs en las regiones del hipotálamo estudiadas son producidos exclusivamente sobre la captación neuronal de NA o sea actúan modulando diferentes mecanismos que, directa y/o indirectamente afectan el NET.

HIPO TALAMO ANTERIOR



HIPO TALAMO POSTERIOR

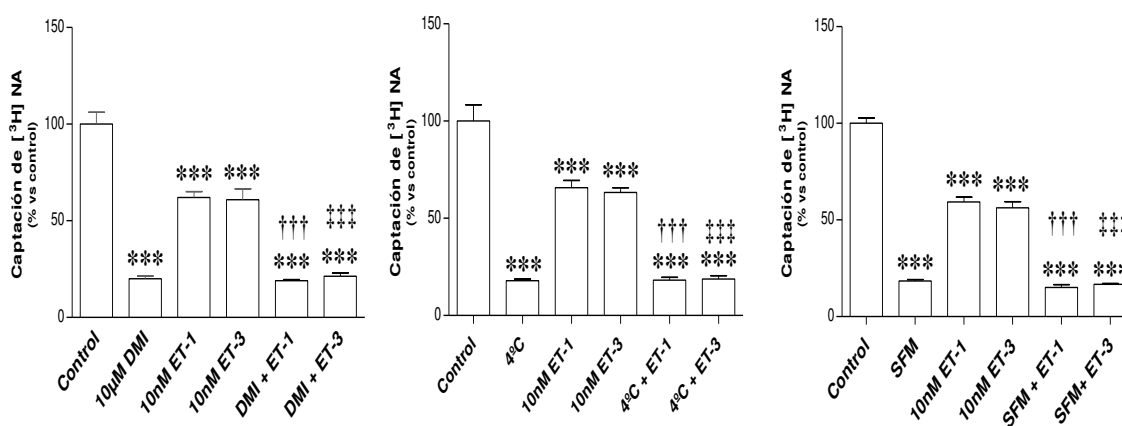


Figura 14: Efectos de las ET-1 y ET-3 sobre la captación de [³H]-NA en HA e HP en presencia de desipramina (DMI), de la incubación a 4°C y en un medio libre de sodio (SFM). Los valores representan la media ± SEM. **p* < 0.05, ***p* < 0.01 y ****p* < 0.001 vs Control; +++*p* < 0.001 vs ET-1; +++*p* < 0.001 vs ET-3. Número de experimentos: 5-7.

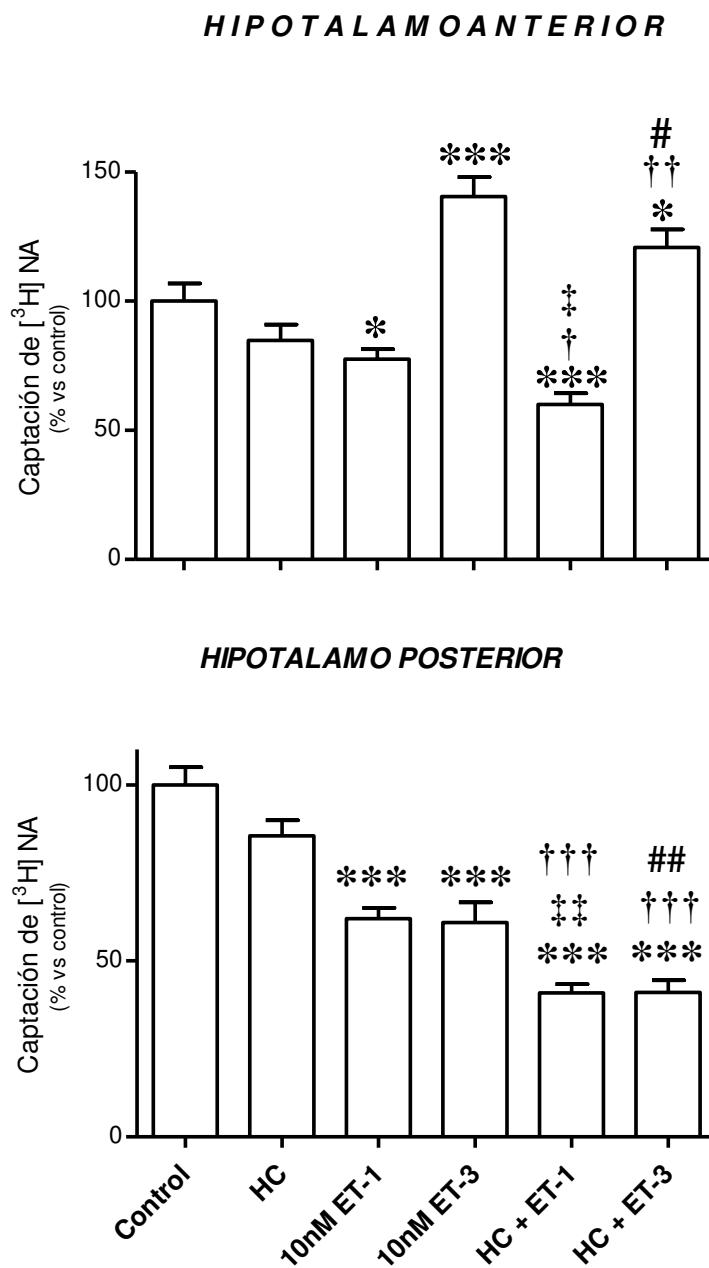
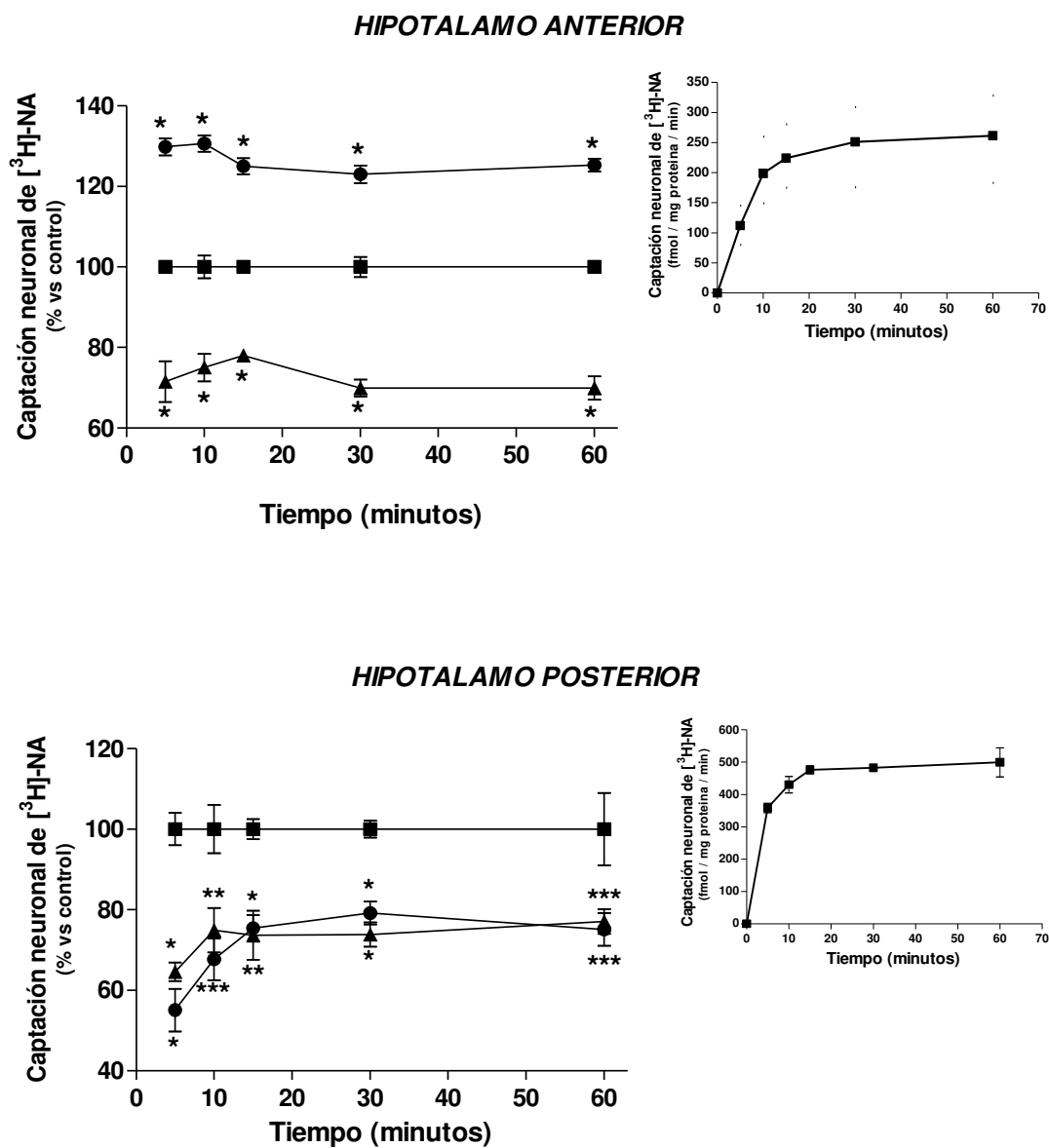


Figura 15: Efectos de las ET-1 y ET-3 sobre la captación de $[^3\text{H}]$ -NA en HA e HP en presencia de hidrocortisona (HC). Los valores representan la media \pm SEM. * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$ vs Control; † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$ y ††† $p < 0.001$ vs HC; ‡ $p < 0.05$ y ‡‡ $p < 0.01$ vs ET-1; # $p < 0.05$ y ## $p < 0.01$ vs ET-3. Número de experimentos: 5-7.

- *Determinación de la curva de captación de NA a diferentes tiempos*

Con el objetivo de determinar la evolución temporal de los efectos de las ETs sobre la captación neuronal NA, los tejidos fueron incubados a diferentes tiempos. En trabajos previos de nuestro laboratorio demostramos que la captación neuronal de NA presenta un comportamiento de hipérbola en donde se puede observar que la pendiente, que corresponde a la captación neuronal propiamente dicha se produce hasta los 10 a 20 minutos aproximadamente en donde la curva comienza a presentar un plateau (*Figura 16 Insertos*).

Por otra parte, la *Figura 16* muestra las modificaciones producidas por las ETs en la captación neuronal de NA durante los diferentes tiempos estudiados (5, 10, 15, 30 y 60 minutos). Los resultados muestran que en el HA la ET-1 disminuye la captación neuronal de NA en todos los tiempos estudiados mientras que la ET-3 la incrementa (*Figura 16*). Por su parte, en el HP ambas ETs disminuyen significativamente captación 1 de la NA en todos los tiempos en que se realizó el experimento (*Figura 16*). Además, se puede observar que los efectos producidos por las ETs sobre la captación neuronal de NA en ambas regiones hipotalámicas estudiadas logran una estabilización (Plateau) no más allá de los 15 minutos, tal como ocurre con la captación 1 control. Por lo tanto, a la luz de los resultados previos y de los obtenidos en el presente trabajo de tesis, podemos confirmar que la incubación con [^3H]-NA durante 5 minutos es el tiempo óptimo para la realización de los experimentos de captación neuronal.



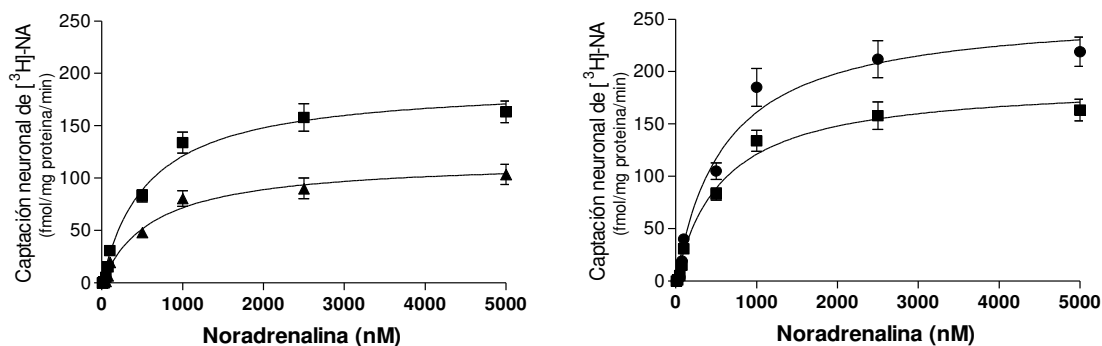
4.1.2- Determinación de los efectos de las ETs sobre la cinética del NET

Cada transportador posee un ciclo biológico determinado con diferente velocidad de recambio. Esta queda básicamente definida por el equilibrio entre los procesos de síntesis y movimiento o tráfico a través de los distintos compartimentos celulares. En lo que se refiere a la densidad sobre la superficie de la célula, los transportadores pueden ser regulados de tal forma que incremente su número (up-regulation) o que la disminuya (down-regulation) (Loder y Melikian 2003, Oaks y Sidhu., 2011). Para dilucidar los efectos que producen las ETs sobre las constantes cinéticas del NET, tanto en el HA como en el HP, se realizaron los estudios utilizando una dilución isotópica de ^3H -NA y determinamos la captación neuronal para cada concentración de la NA. De estos resultados se realizó un análisis de regresión no lineal para obtener K_m y la V_{max} (Apparsundaram, 2001; Bryan-Lluka y col., 2001).

Los resultados obtenidos muestran que el HA la ET-1 (10 nM) disminuyó la V_{max} en un 34% y que la ET-3 (10 nM) la incrementó en un 36%, sin que se observaran cambios significativos en la K_m (Fig 17 y Tabla V).

Por su parte en el HP tanto ET-1 como la ET-3 (10nM) disminuyeron la V_{max} (el 33% y el 34%, respectivamente), sin que se modifique la K_m (Fig 18 y Tabla V).

HIPOTALAMO ANTERIOR



HIPOTALAMO POSTERIOR

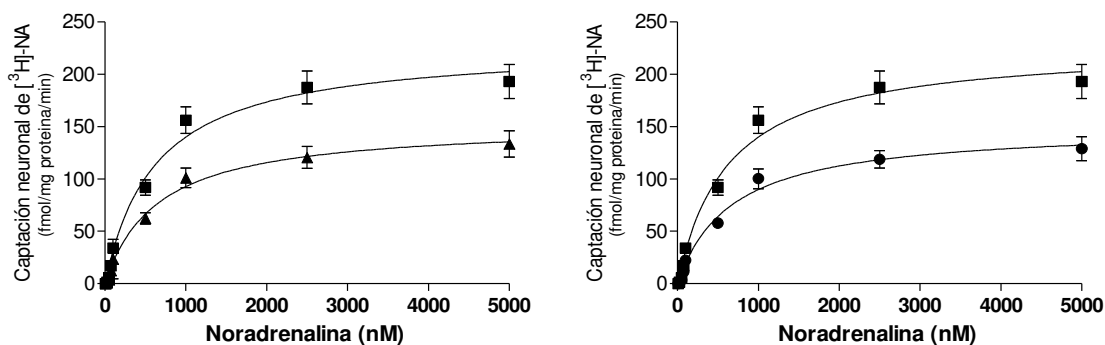


Figura 17: Efectos de ET-1 y ET-3 sobre la cinética del transportador neuronal de NA en el hipotálamo anterior y posterior. Los valores se expresan como captación neuronal de $[^3\text{H}]\text{-NA}$ (fmol/mg de proteína/min) y representan la media \pm SEM. Los datos corresponden a 4 experimentos realizados por triplicado. ■: Control, ▲: ET-1 10 nM y •: ET-3 10 nM.

Tabla V: Efectos de la ET-1 y ET-3 sobre las constantes cinéticas del transportador neuronal de NA (NET). Los parámetros cinéticos (V_{max} y K_m) se calcularon de la curva captación de neuronal de $[^3H]$ -NA de la Fig 18. Los valores fueron obtenidos a través de análisis de regresión no lineal (Apparsundaram, 2001; Bryan-Lluka y col, 2001). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ vs Control.

Parámetros cinéticos	Control	10nM ET-1	10nM ET-3
HA			
K_m (μM)	0.61 ± 0.27	0.68 ± 0.24	0.66 ± 0.14
V_{max} (fmol/mg proteína/min)	190.4 ± 9.8	$117.7 \pm 7.0^{***}$	$258.2 \pm 16.8^*$
HP			
K_m (μM)	0.62 ± 0.17	0.67 ± 0.14	0.67 ± 0.11
V_{max} (fmol/mg proteína/min)	228.0 ± 12.6	$153.2 \pm 6.7^{**}$	$150.1 \pm 7.8^{**}$

Con el objeto de conocer la efectividad del transportador que es un indicador de eficiencia catalítica de translocación, se realizó la relación V_{max}/K_m . (Graefe y Bönisch, 1988). Del análisis del mismo se observa que ET-1 redujo la efectividad en un 43% y ET-3, la aumenta en un 30% en HA, mientras que en HP, ambas ETs, la reducen en un 44 y 30%, respectivamente (Figura 18).

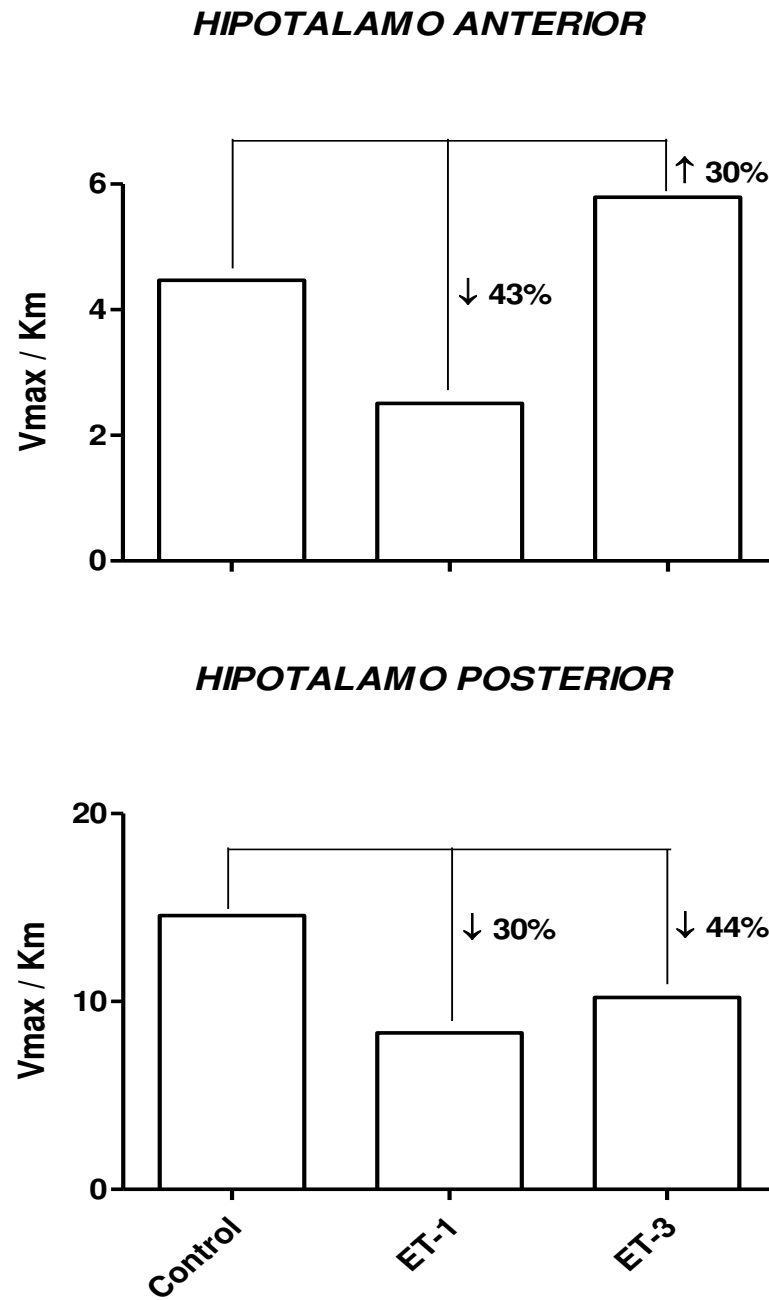


Figura 18: Efectos de la ET-1 y ET-3 sobre la efectividad del transportador mediante el análisis de la relación relación Vmax/ Km.

4.1.3- Determinación de los receptores involucrados

Las acciones de las ETs se producen a través de la activación de dos receptores que fueron caracterizados hasta el presente denominados ET_A y ET_B (Davenport, 2002; D'Orleans-Juste y col., 2002; D'Orleans-Juste y col., 2003; Schneider y col., 2007; Vatta y col, 2009). Las armas con las que se cuentan para definir el/los subtipo/s de receptores involucrados en los efectos de las ETs sobre la captación neuronal de NA son antagonistas específicos ET_A y ET_B y agonistas específicos ET_B e inespecíficos ET_A/ET_B. En lo que respecta a los antagonistas en el presente trabajo de Tesis se utilizaron el BQ-610 y BQ-788 como antagonistas específicos de los receptores ET_A y ET_B, respectivamente. Para cumplir con el objetivo planteado se realizaron en los HA y HP siguientes grupos experimentales:

✓ Control	✓ Control
✓ ET-1 10 nM	✓ ET-3 10 nM
✓ BQ-610 100 nM	✓ BQ-610 100 nM
✓ BQ-788 100nM	✓ BQ-788 100nM
✓ BQ-610 + ET-1	✓ BQ-610 + ET-3
✓ BQ-788 + ET-1	✓ BQ-788 + ET-3

Los resultados obtenidos muestran que ambos antagonistas no poseen efectos per-se en ambas regiones hipotalámicas estudiadas (Figs. 19 y 20).

En el HA el efecto inhibitor de la ET-1 fue bloqueado por en antagonista ET_B, mientras que el BQ-610 no modificó la inhibición producida por este péptido (Fig 19). Por su parte, el efecto estimulador de la ET-3 sobre la captación neuronal de NA fue inhibido por ambos antagonistas (Fig 20).

En el HP, la disminución de la captación neuronal de NA producida por la ET-1 se inhibió por el BQ-788 sin ser afectada por el BQ-610 (Fig 20). Sin embargo, ambos antagonistas abolieron la reducción de la captación neuronal de la amina producida por la ET-3 (Fig 20).

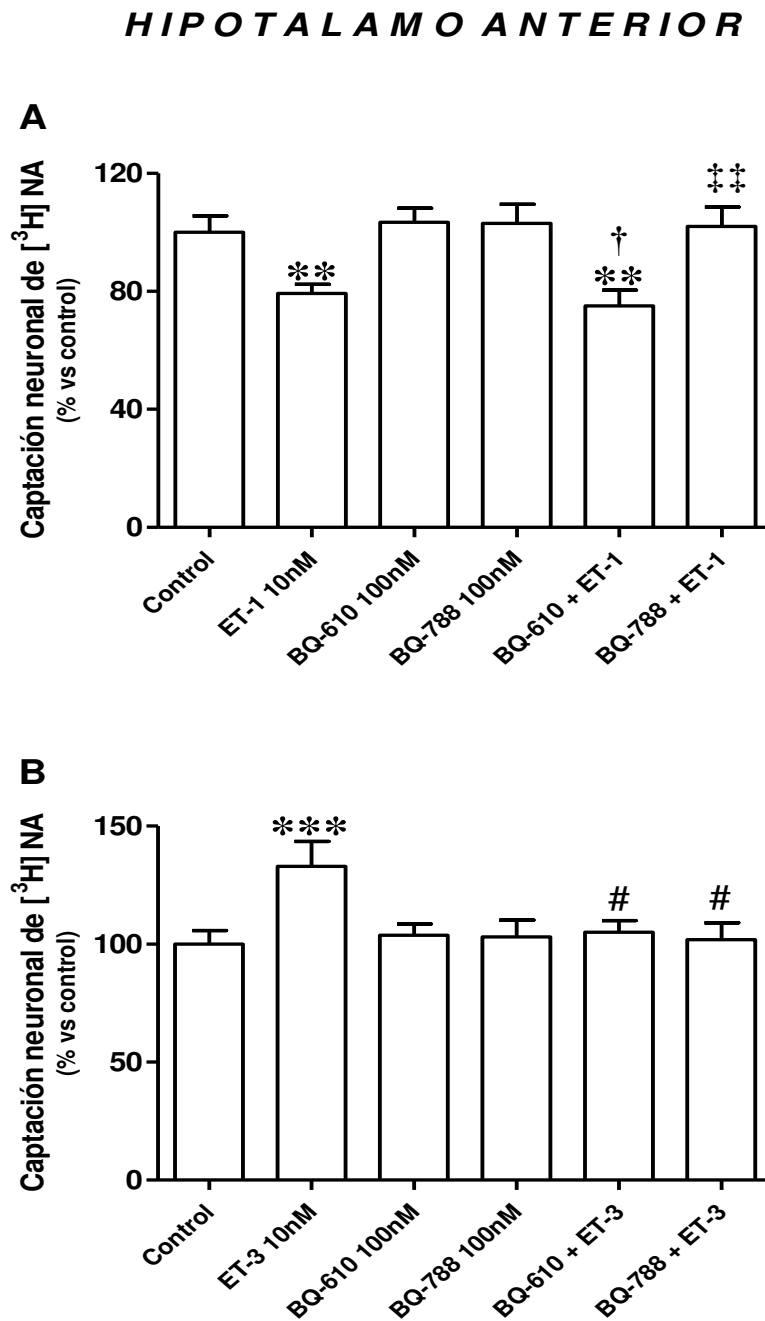


Figura 19: Efectos de la ET-1 (A) y ET-3 (B) sobre la captación neuronal de [^3H]-NA en presencia de los antagonistas de receptores ET_A (BQ-610) y ET_B (BQ-788) en el HA. Los valores se expresan como % vs el control y representan la media \pm SEM. ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ vs. control; $^\dagger p < 0.05$ vs BQ-610; $^\ddagger\ddagger p < 0.01$ vs ET-1 y $^\# p < 0.05$ vs ET-3. Número de experimentos: 6- 7.

HIPO TALAMO POSTERIOR

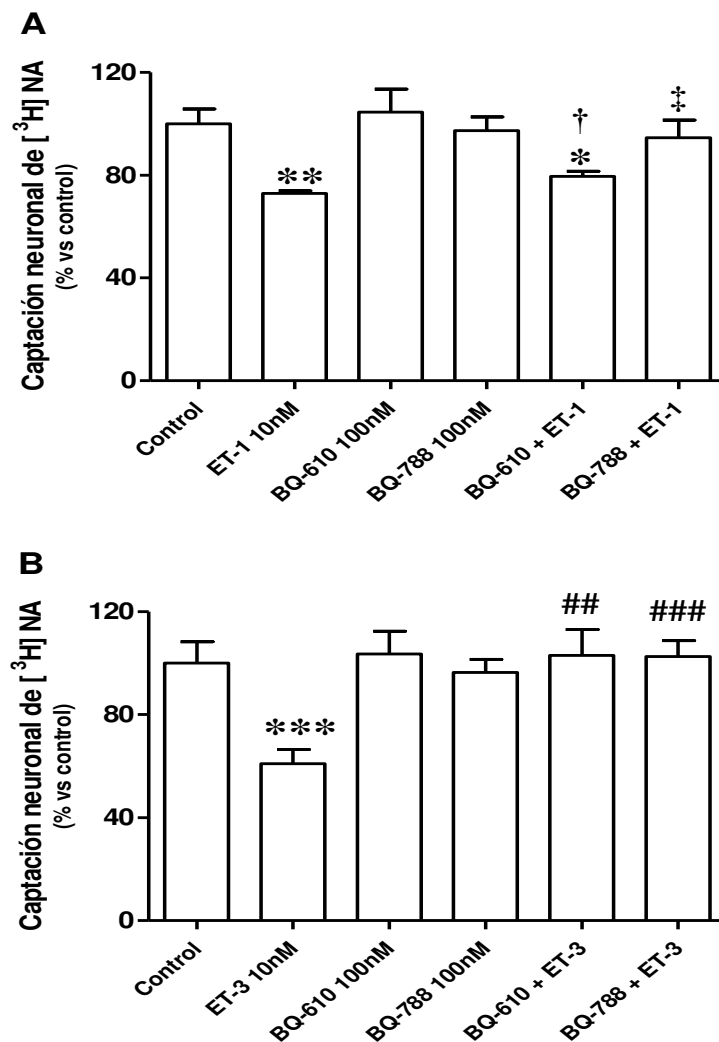


Figura 20 Efectos de la ET-1 (A) y ET-3 (B) sobre la captación neuronal de $[^3\text{H}]$ -NA en presencia de los antagonistas de receptores ET_A (BQ-610) y ET_B (BQ-788) en el hipotálamo posterior. Los valores se expresan como % vs el control y representan la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ vs. Control; † $p < 0.05$ vs BQ- 610; ‡ $p < 0.05$ vs ET-1; ## $p < 0.01$ y ### $p < 0.001$ vs ET-3. Número de experimentos: 6- 7.

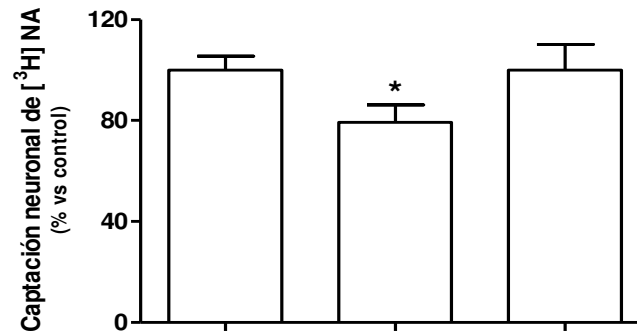
Los resultados obtenidos en estos últimos experimentos dejan en claro que los efectos de la ET-1 sobre la captación neuronal de NA, tanto en el HA como en el HP, son mediados a través del receptor ET_B. Por su parte, los efectos opuestos observados para la ET-3 en el HA y el HP (aumento y disminución de la captación de NA, respectivamente), son mediados a través de receptores atípicos, ya que ninguno de los antagonistas usados nos permiten definir cuál de los receptores clásicos estaría involucrado.

Con el objeto de poder comprender un poco más cual y/o cuales receptores de ETs estarían involucrados en las respuestas observadas, los HA y HP fueron incubados en presencia de un agonista específico del receptor ET_B, el IRL-1620 1 μ M y de un agonista no selectivo ET_A/ET_B, la Sarafotoxina-6b (SRTx 6b) 300nM.

Los resultados muestran que tanto en el HA como en el HP el agonista no selectivo, SRTx 6b, disminuye la captación neuronal de NA (Fig.21). Sin embargo, el IRL-1620 solo disminuye la captación de la amina en el HP sin afectar este proceso en el HA (Fig.21).

Si nos basamos en los experimentos realizados en presencia de los antagonistas específicos, los resultados son claros. Sin embargo los resultados obtenidos utilizando los agonistas se puede determinar claramente la dificultad para poder definir sobre que receptor específico actúan las ETs.

HIPOTALAMO ANTERIOR



HIPOTALAMO POSTERIOR

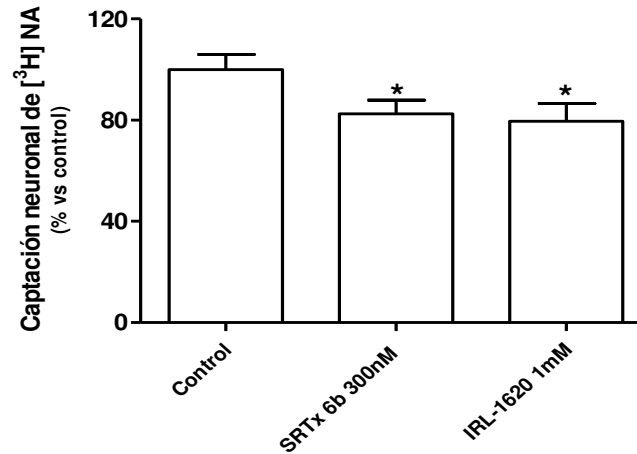


Figura 21: Efectos de los agonistas de los receptores $\text{ET}_{\text{A/B}}$ (SRTx-6b) y ET_{B} (IRL-1620) sobre la captación neuronal de NA en HA y en HP. Los valores se expresan como % vs el control y representan la media \pm SEM. * $p < 0.05$ vs Control. Número de experimentos: 6 – 7.

4.1.4- Determinación de los mecanismos intracelulares involucrados

Una característica de los receptores de ETs es que son considerados “Receptores promiscuos”. Estos subtipos de receptores pueden acoplarse a diferentes proteínas G que dependen no solo del receptor sino también del tipo de tejido, la concentración de ET, etc (*Opgenorth y col., 1995; Sokolovsky M, 1995; Kuwaki y col., 1997; Naicker y col., 2001; D’Orleans-Juste y col., 2002; Motte y col., 2006, Vatta y col, 2009*). Por otra parte, tal como fue descrito en la introducción, las ETs activan diferentes vías intracelulares, muchas de las cuales, están involucradas en la regulación de la actividad del NET (*Bönisch y Brüss, 2006;; Mandela y Ordway, 2006, Motte y col., 2006; Mathison y col., 2007; Vatta y col, 2009, Watts S, 2010, Horinouchi y col., 2013*).

Con el objeto de identificar las vías de señalización implicadas en los efectos de las ETs sobre la captación neuronal de NA tanto en el HA como en el HP, se realizaron los experimentos en presencia de diferentes antagonistas, inhibidores, agonistas y/o análogos. De esta manera podremos dilucidar cual y/o cuales vías intracelulares están implicadas.

-Participación de la proteína G

Se sabe que los receptores de ETs se encuentran acoplados a proteína G. Sin embargo, no solo en nuestro laboratorio, sino que diversos autores demostraron comportamientos atípicos de muchos de los efectos de las ETs. Es así que algunos trabajos sugieren la posible existencia de receptores que en algunos casos fueron denominados atípicos o no clásicos (*Nambi y col., 2000; Hatea y col., 2007; di Nunzio y col., 2002, 2004; Perfume y col., 2007, 2008; Watts S, 2010, Horinouchi y col., 2013*). Por todo esto y basados en los resultados obtenidos previamente en esta tesis, es que decidimos determinar si los comportamientos atípicos observados en donde no es posible definir que receptor estaría involucrado, son producidos por receptores que están acoplados a proteína G.

Con este fin, determinamos los efectos de la ET-1 y ET-3 en presencia de SMN 500 nM, un inhibidor general de la proteína G en esta concentración. Es importante tener en cuenta que la especificidad de inhibición de la proteína G por la SMN depende de la concentración utilizada. La SMN también inhibe canales rianodina sensibles y receptores purinérgicos de tipo P2 a

concentraciones significativamente mayores que la utilizada para inhibir a proteínas G, por lo que la concentración utilizada en este trabajo de Tesis inhibe sólo a las proteínas G. (Guarnieri y col., 2004; Wollmann y col., 2005; Runden-Pran y col., 2005; Rodríguez y col., 2005; Pooler y col., 2005; Sergeev y col., 2006; Wirkner y col., 2007).

Para cumplir con el objetivo planteado se realizaron los siguientes grupos experimentales:

- ✓ Control
- ✓ ET-1 10 nM
- ✓ ET-3 10 nM
- ✓ SMN 500 nM
- ✓ SMN + ET-1
- ✓ SMN + ET-3

Los resultados obtenidos mostraron que la SMN no presentó efectos per se, sin embargo inhibe por completo los distintos efectos producidos por la ET-1 y la ET-3 sobre la captación neuronal de NA en ambas regiones hipotalámicas estudiadas (*Fig 22*)

Por lo tanto, éstos resultados confirman que de los efectos observados mediados por los receptores clásicos (ET_A y/o ET_B) están acoplados a proteína G. Sin embargo el dato más importante de estos resultados son los efectos que son mediados a través de los llamados receptores atípicos, ya que podemos comprobar que estos están acoplados a proteína G.

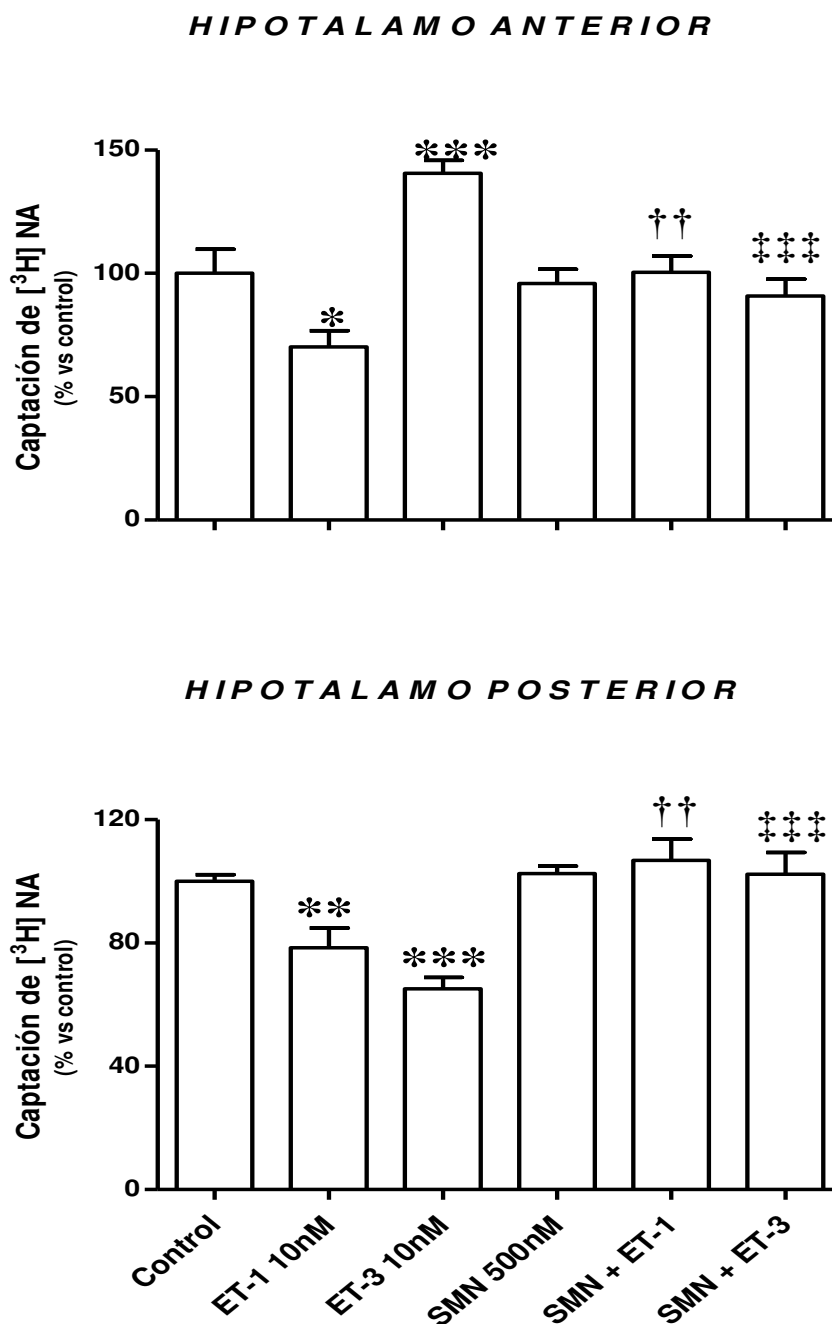


Figura 22: Efectos de la ET-1 y ET-3 sobre la captación en presencia de suramina (SMN, inhibidor de proteína G) en el HA y el HP. Los valores se expresan como % vs el control y representan la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ vs control; †† $p < 0.01$ vs ET-1; ‡‡‡ $p < 0.001$ vs ET-3. Número de experimentos: 6 -7.

- Participación de la vía del óxido nítrico

Se sabe, por diversos trabajos, que la activación del receptor ET_B se encuentra muy relacionada con el aumento de la actividad de la NOS y el consecuente incremento de la producción de NO (Hirata y col., 1993; Owada y col., 1994; di Nunzio y col., 2002; Mathinson y col., 2002; Jaureguiberry y col., 2004; Rossi y col., 2006). Además, ya hemos comentado previamente, el óxido nítrico se encuentra involucrado en el control la presión arterial mediado por el sistema noradrenérgico al interferir con la liberación de NA (Greenberg y col., 1990, Simaan y Sabra, 2011) y mediante la reducción de la captación neuronal de esta amina en terminales nerviosas sinápticas y neuronas noradrenérgicas (Kaye y col., 1997, Simaan y Sabra, 2011).

Sobre esta base y con el objeto de determinar si ésta vía intracelular está involucrada en los efectos inducidos por ET-1 y ET-3 sobre la captación neuronal de NA en el HA y HP, los tejidos fueron incubados en presencia de L-NAME, 7-NI, ODQ y KT-5823 (inhibidores de la NOS, NOS neuronal, Guanilato ciclase soluble y PKG, respectivamente). Para cumplir con el objetivo planteado se realizaron los siguientes grupos experimentales:

- ✓ Control
- ✓ ET-1 10 nM
- ✓ ET-3 10 nM
- ✓ Inhibidor (L-NAME 10μM, 7-NI 10μM, ODQ 10μM o KT-5823 2μM)
- ✓ Inhibidor + ET-1
- ✓ Inhibidor + ET-3

Los resultados muestran que ninguno de los inhibidores poseen efectos *per se* sobre la captación de NA en las regiones hipotalámicas estudiadas (Fig 23- 24- 25- 26- 27- 28)

Los resultados muestran que en el HA la inhibición de la captación neuronal de NA producida por la ET-1 fue bloqueada por el L-NAME, el 7-NI. Estos datos demuestran claramente que los efectos producidos por la ET-1 son mediados vía la activación de la NOS neuronal (L-NAME y 7-NI) (Fig 23 A y B). Por su parte, el incremento en la captación neuronal de NA inducido por ET-3 no se modificó en presencia del inhibidor de la NOS (Fig 23 A y B). Por lo tanto estos efectos no serían mediados por la vía del ON.

Debido a que el NO producido puede unirse al grupo hemo de la guanilato ciclasa soluble, activándola e incrementando los niveles de GMPc (*Bredt y col., 1991*), el que, a su vez, activa la PKG con la consiguiente fosforilación de proteínas que pueden actuar regulando el NET (*Hirata y col., 1993; Owada y col., 1994; di Nunzio y col., 2002; Mathinson y col., 2002; Jaureguiberry y col., 2004; Rossi y col., 2006, Horinouchi y col., 2013*). Por ésta razón seguimos investigando el paso que sigue de ésta vía mediante la incubación en presencia de inhibidores de la guanilato ciclasa NO-sensible y PKG (ODQ y KT-5823, respectivamente). Los resultados obtenidos nos muestran que en nuestro caso, la posible formación de NO, no estaría actuando sobre la activación de la guanilato ciclasa soluble y la PKG (Fig. 24 A y B).

Con el objeto de dilucidar y confirmar estos efectos observados, el HA se incubó en presencia de un dador de ON, el nitro prusiato de sodio (SNP) observándose que el mismo disminuye la captación neuronal de NA (Fig. 25 A). Cuando el mismo es incubado con la previa adición de ODQ, el efecto del SNP se bloquea (Fig. 25 A). Por otra parte, en otro experimento, se incubó la ET-1 en presencia de una agonista del GMPc. Los resultados muestran que no existe efecto aditivo sobre la disminución de la captación neuronal de NA producida por la ET-1 (Fig. 25 B). A la luz de estos resultados se puede comprobar que la ET-1 en el HA activa la NOS neuronal e incrementa la producción de ON (*di Nunzio y col., 2002; Jaureguiberry y col., 2004*) pero no modifica cascada abajo la vía del ON (guanilato ciclasa soluble y PKG) para modificar la captación neuronal de NA.

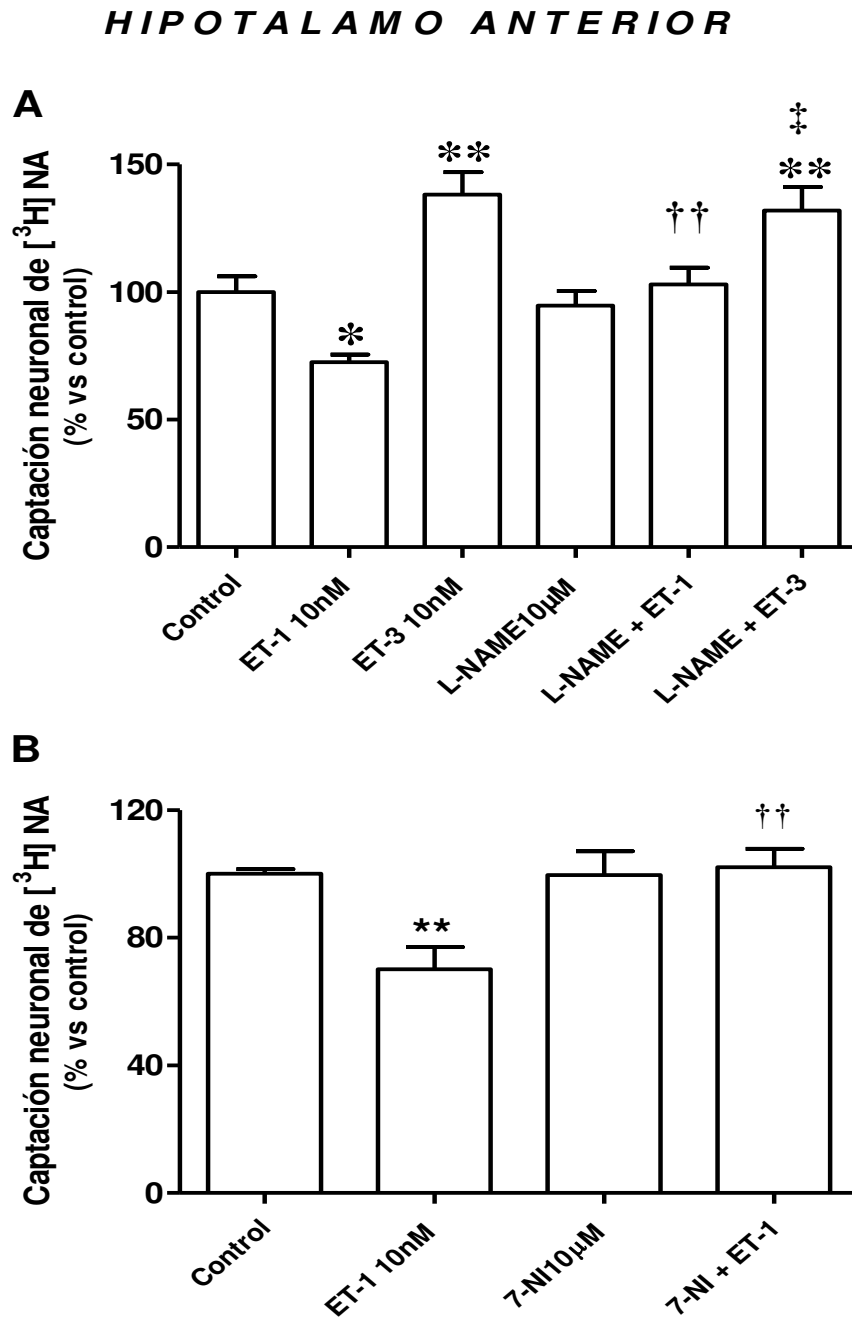


Figura 23: Efectos de la ET-1 y ET-3 sobre la captación de NA en presencia de un inhibidor de la NOS (L-NAME, A) y de la NOS neuronal (7-NI, B) en HA. Los valores se expresan como % vs el control y representan la media \pm SEM. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ vs control; †† $p < 0.01$ vs ET-1; † $p < 0.05$ vs L-NAME. Número de experimentos: 6 -7.

HIPOTALAMO ANTERIOR

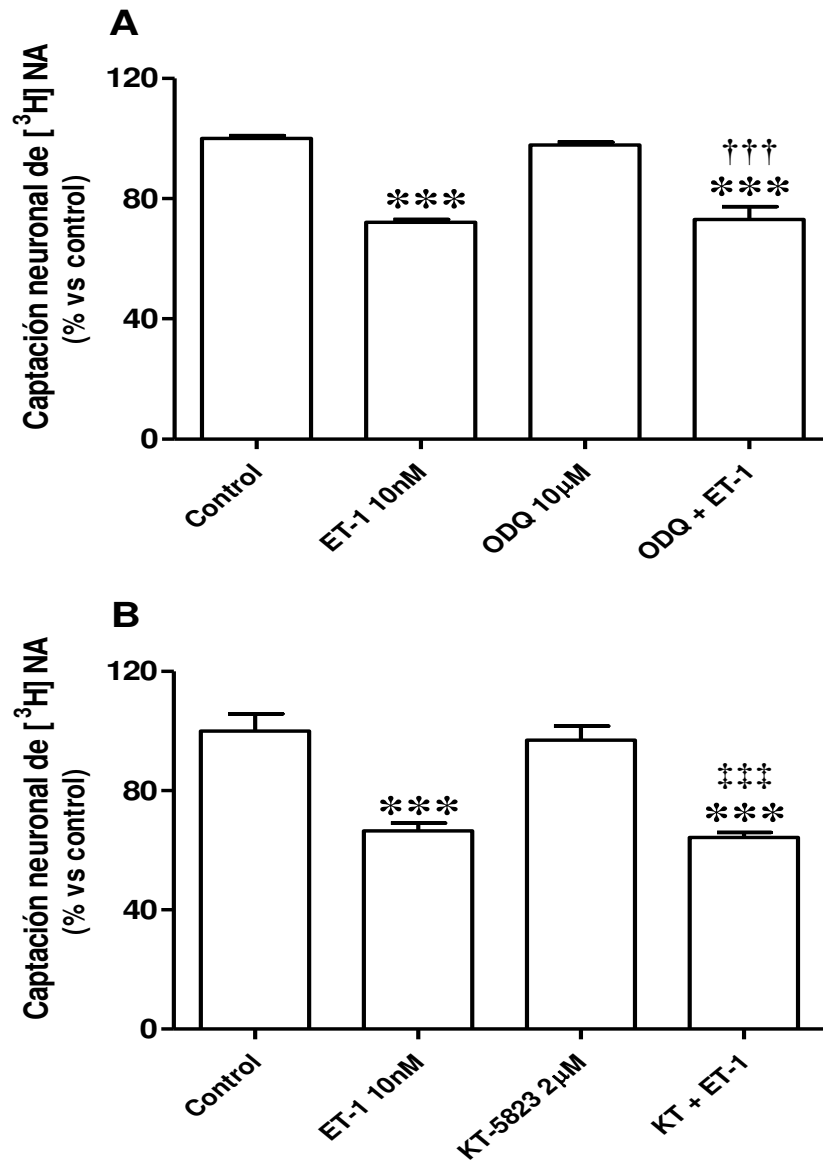


Figura 24: Efectos de ET-1 sobre la captación de NA en presencia de un inhibidor de la guanilato ciclasa soluble (ODQ, A) y de la PKG (KT-5823, B) en HA. Los valores se expresan como % vs el control y representan la media \pm SEM. *** $p < 0.001$ vs control; ††† $p < 0.001$ vs ODQ; ‡‡‡ $p < 0.001$ vs KT-5823. Número de experimentos: 6 -7.

HIPO TALAMO ANTERIOR

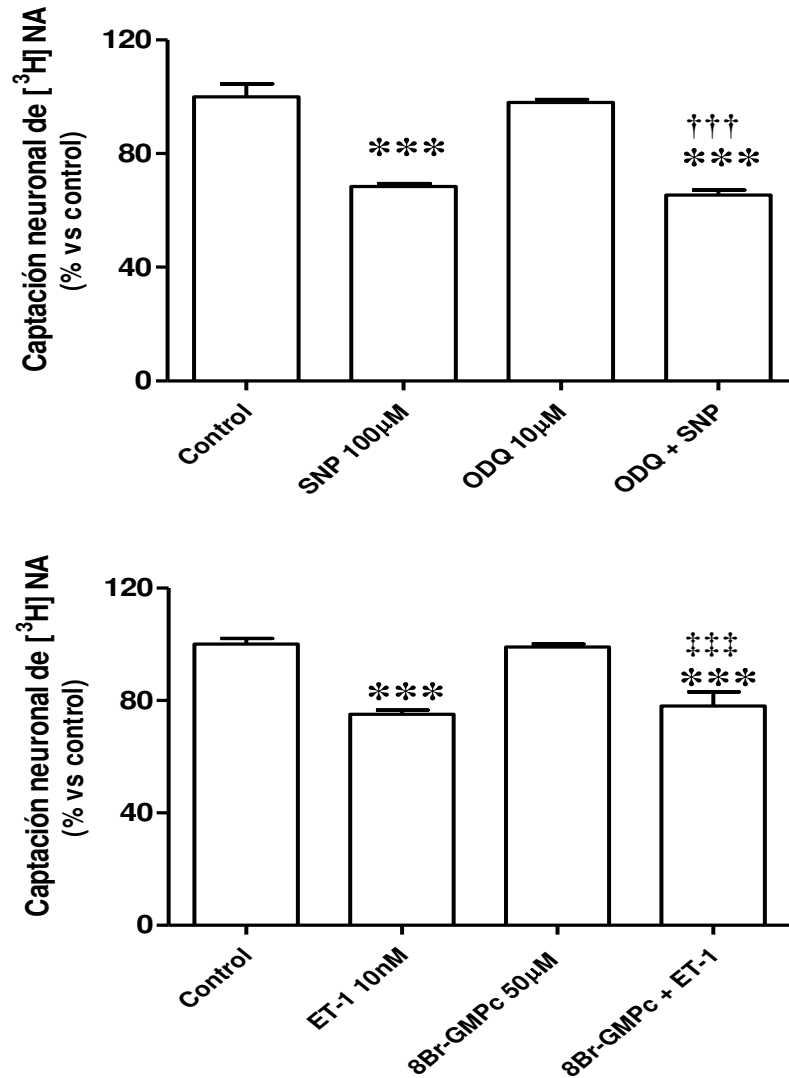


Figura 25: Efectos de un donador de ON (nitroprusiato de sodio, SNP) y un agonista de GMPc (8 Br-cGMP) sobre la captación neuronal de NA en HA. Los valores se expresan como % vs el control y representan la media \pm SEM. *** $p < 0.001$ vs control; ††† $p < 0.001$ vs ODQ; ††† $p < 0.001$ vs 8Br GMPc. Número de experimentos: 6 -7.

Por su parte en el HP observamos, tanto para la ET-1 como para la ET-3, resultados similares a los obtenidos en HA con la ET-1. O sea, el L-NAME y 7-NI inhiben la reducción de la captación neuronal de NA producido por ambas ETs (Fig. 26 A y B), mientras que el ODQ y el KT-5823 no modifican los efectos producidos por ET-1 y ET-3 (Fig. 27 A y B). Con el objeto de comprobar estos resultados, los tejidos fueron incubados con un dador de ON, el SNP en ausencia y en presencia de un antagonista de la de la guanilato ciclasa soluble observamos que la inhibición de la captación neuronal de NA no fue afectada por el ODQ (Fig 28 Ay B). Por otra parte, la incubación de ET-1 y ET-3 en presencia del 8Br-GMPc mostró que no hay efecto aditivo con estos péptidos (Fig 28Ay B). Tal como fuera observado en el HA, en este caso ambas ETs inhiben la captación neuronal de NA involucrando solo la formación de NO sin la participación de la PKG. Tanto para lo observado para el HA con la ET-1 como en el HP con ambas ETs, no podemos, al menos con los resultados obtenidos, determinar de qué manera el ON directa o indirectamente afecta la captación de NA.

HIPOTALAMO POSTERIOR

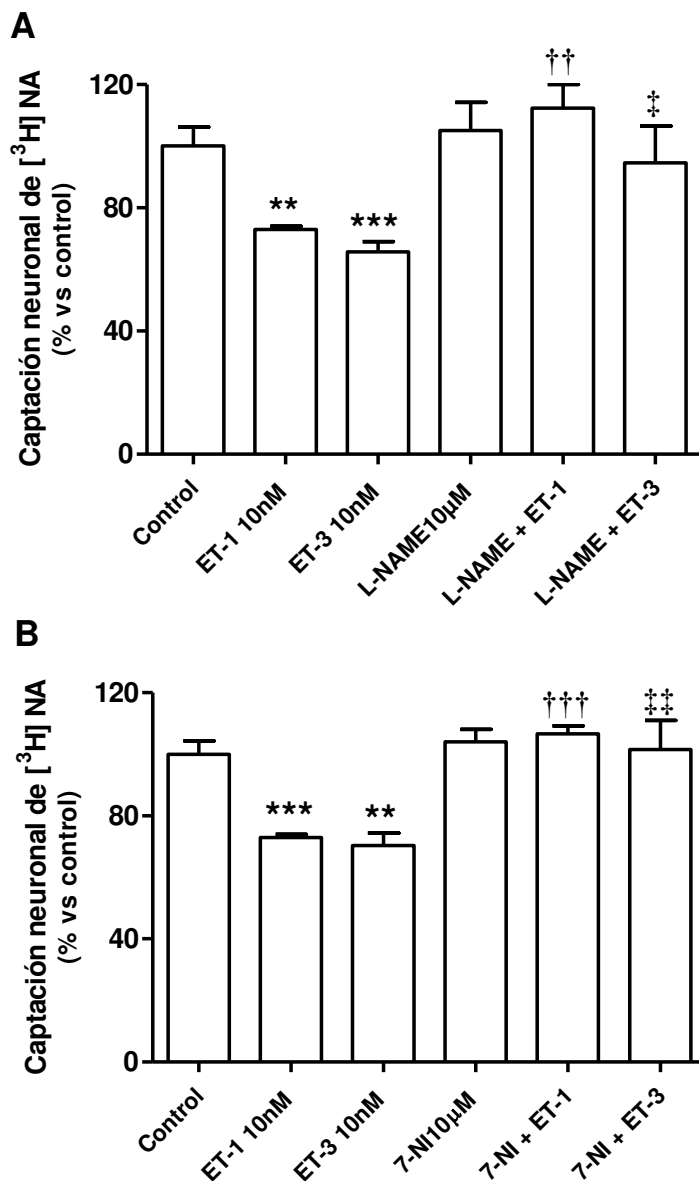


Figura 26: Efectos de ET-1 y ET-3 sobre la captación de NA en presencia de un inhibidor de la NOS (L-NAME, A) y de la NOS neuronal (7-NI, B) en HP. Los valores se expresan como % vs el control y representan la media \pm SEM. ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ vs control; †† $p < 0.01$ y ††† $p < 0.001$ vs ET-1 y ‡ $p < 0.05$ y ‡‡ $p < 0.01$ vs ET-3. Número de experimentos: 6 -7.

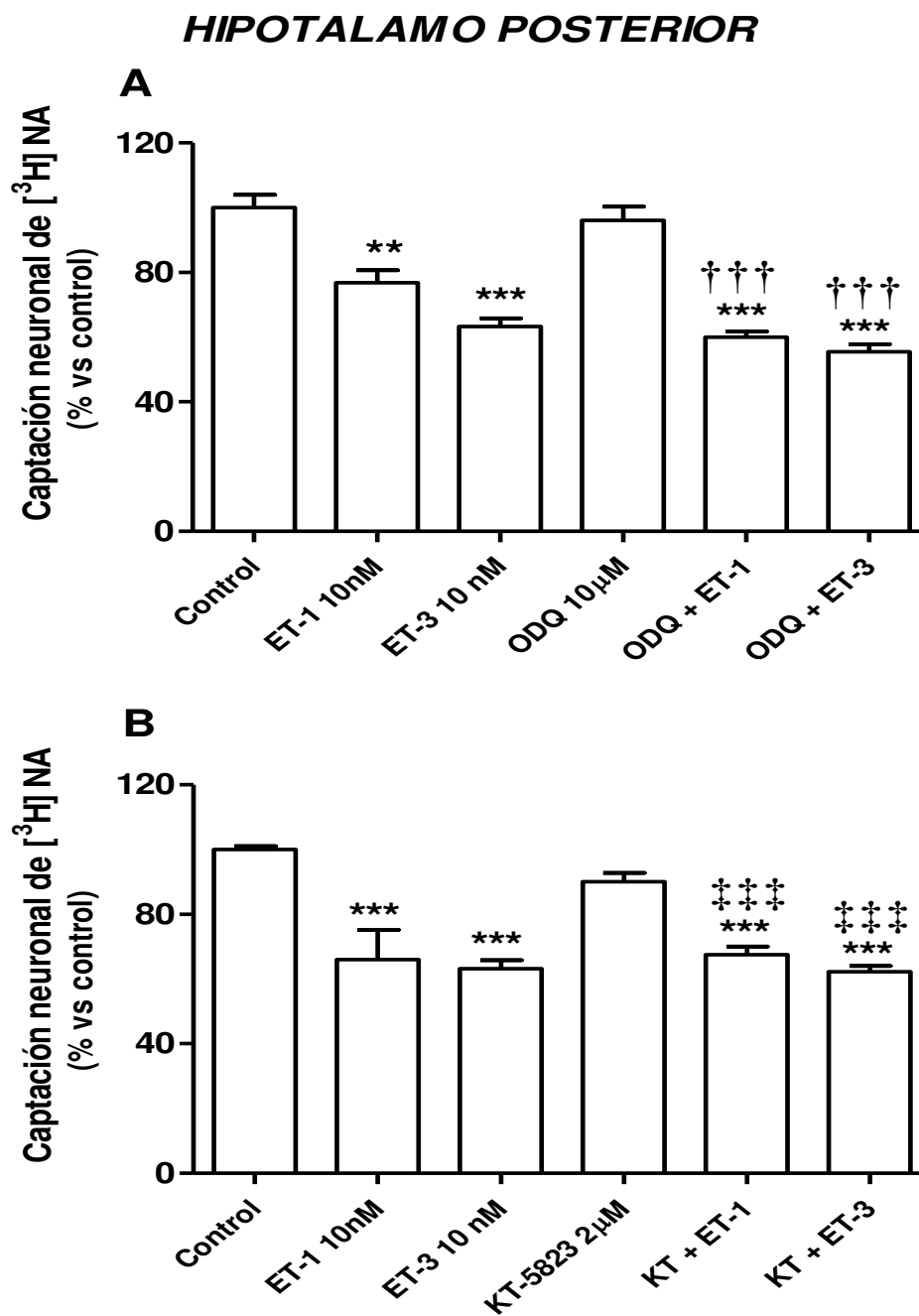


Figura 27: Efectos de ET-1 y ET-3 sobre la captación de NA en presencia de un inhibidor de la guanilato ciclasa soluble (ODQ, A) y de la PKG (KT-5823, B) en HP. Los valores se expresan como % vs el control y representan la media \pm SEM. ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ vs control; ††† $p < 0.001$ vs ODQ; ††† $p < 0.001$ vs KT-5823. Número de experimentos: 6 -7.

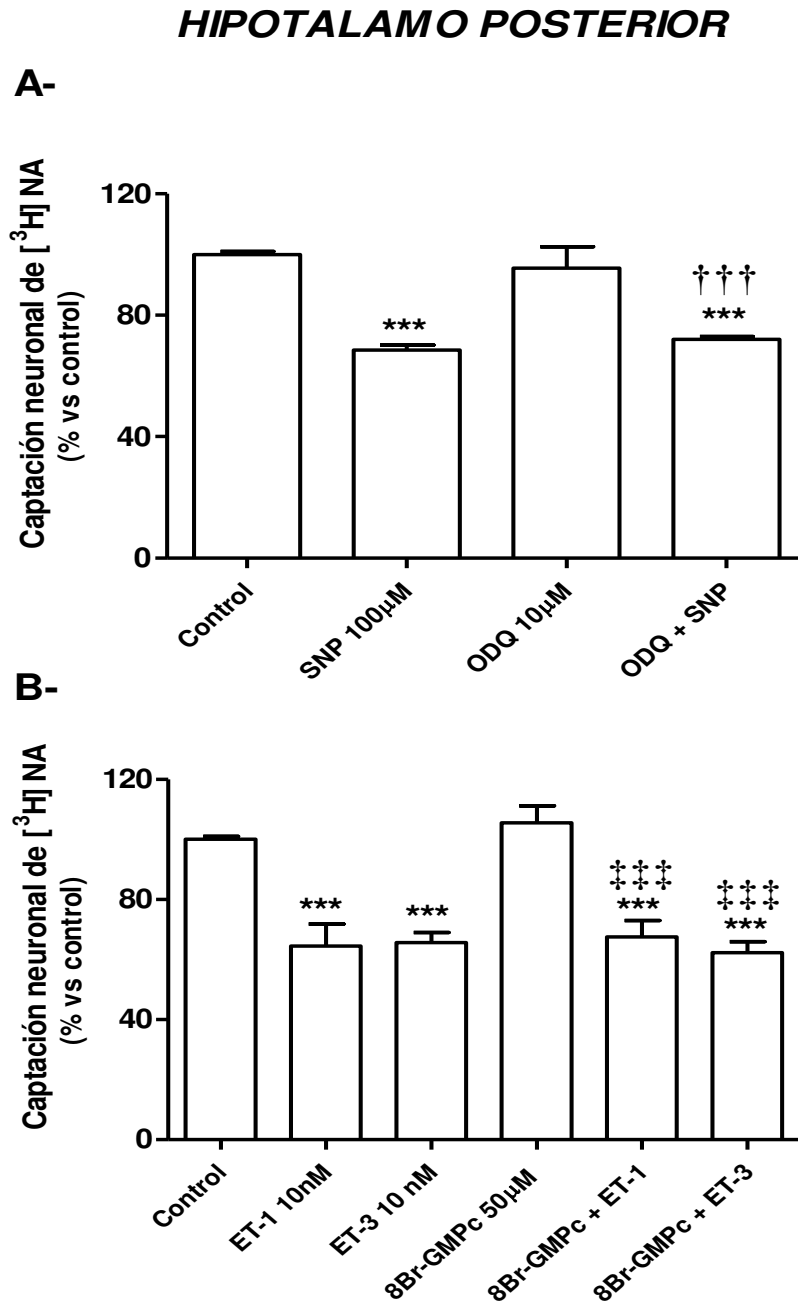


Figura 28: Efectos de un donador de ON (nitroprusiato de sodio, SNP) y un agonista de GMPc (8 Br-cGMP) sobre la captación neuronal de NA en HP. Los valores se expresan como % vs el control y representan la media \pm SEM. *** p <0.001 vs control; ††† p <0.001 vs ODQ; ‡‡‡ p <0.001 vs 8Br GMPc. Número de experimentos: 6 -7.

- Participación de la vía de los fosfoinosítidos

La vía de los fosfoinosítidos se inicia con la activación de PLC por una proteína Gq, la que cliva fosfolípidos de membrana liberando IP₃ y DAG (Resink y col., 1988; Stojilkovic y col., 1996; Kuwaki y col., 1997). El primero se une a receptores específicos de IP₃ del retículo endoplasmático incrementando la concentración de Ca²⁺ en el citoplasma y el segundo activa PKC con la consiguiente fosforilación de proteínas target (Sokolovsky, 1995; Hynynen y col, 2006; Nilsson y col, 2008,, Horinouchi y col., 2013). Como fuera comentado previamente, el NET presenta sitios de fosforilación por PKC y por kinasas dependientes de Ca²⁺ (Jayanthi y Ramamoorthy , 2005, Jayanthi y col,2006, Sung y Blackely, 2007, Ramamoorthy y col., 2011). Estos antecedentes sugieren la hipótesis de que esta vía podría ser un mecanismo importante a través del cual las ETs podrían ejercer algunos de sus efectos moduladores sobre el NET que fueran observados previamente.

Para verificar esta hipótesis, se utilizaron inhibidores de la PKC (GF-109203x) y un antagonista de los receptores específicos para IP₃ del retículo endoplasmático, el 2-APB. Con el objeto de estudiar esta vía se realizaron los siguientes grupos experimentales:

- ✓ Control,
- ✓ ET-1 10 nM,
- ✓ ET-3 10 nM,
- ✓ Inhibidor (GF-109203x 10μM o 2-APB 2μM)
- ✓ Inhibidor + ET-1,
- ✓ Inhibidor + ET-3.

Los resultados muestran que ni en el HA ni en el HP el inhibidor de la PKC (GF-109203x) no posee efectos *per se* sobre la captación neuronal de NA (Fig 29 y 30 A) Sin embargo en ambas regiones hipotalámicas estudiadas, el antagonista de los receptores de IP₃ (2-APB) indujo una reducción significativa de la captación 1 de NA (Fig 29 y 30 B)

En el HA, la inhibición de la PKC por el GF-109203x redujo a valores controles la captación neuronal de NA inducida la ET-1 (Fig 29 A) En lo que respecta al bloqueo del receptor de IP₃, se observa la ET-1 mantiene la reducción de la captación 1 de NA comparado con el 2-APB (↓30%) y

que corresponde a un porcentaje similar al producido por este péptido frente al control ($\downarrow 30\%$) (Fig 29 B)

En lo que respecta al incremento en la captación neuronal de NA producida por la ET-3 en el HA, podemos observar que mientras la inhibición de la PKC no la modifica (Fig 29 A), el bloqueo del receptor de IP₃ produce una disminución parcial, aunque no significativa, en el incremento de la captación de la amina (Fig 29 B).

Los resultados obtenidos en el HP muestran que la inhibición de la captación neuronal de NA producida por la ET-1 y por la ET-3 es llevado a los valores controles por la inhibición de la PKC (Fig 29 A). Por otra parte, el antagonista del receptor de IP₃ disminuye *per se* la captación de NA, pero cuando se incuban conjuntamente las ETs con el 2-APB estos péptidos mantienen la disminución de este proceso (ET-1, $\downarrow 39\%$ y ET-3, $\downarrow 33\%$ vs 2-APB). Es importante destacar, que como ocurre con la ET-1 en el HA, estos valores son similares a la disminución que producen estos péptidos *per se* (35 a 40%, aproximadamente) (Fig 30 A)

Con el objeto de corroborar que la activación de la PKC está involucrada en la disminución de la captación neuronal de NA producidos por las ETs en ambas regiones hipotalámicas estudiadas, se incubaron los HA e HP en presencia de un activador de esta quinasa, el PMA. Los resultados muestran que tanto en el HA como en el HP el PMA disminuye significativamente la captación neuronal de NA (Fig 31 A y B).

Estos hallazgos demuestran que la vía de los fosfoinosítidos participaría, al menos de manera parcial, en los efectos inhibidores de las ETs sobre la captación neuronal de NA. Por el contrario, no tiene efecto alguno sobre el incremento en la captación de NA inducido por ET-3 en el HA.

HIPOTALAMO ANTERIOR

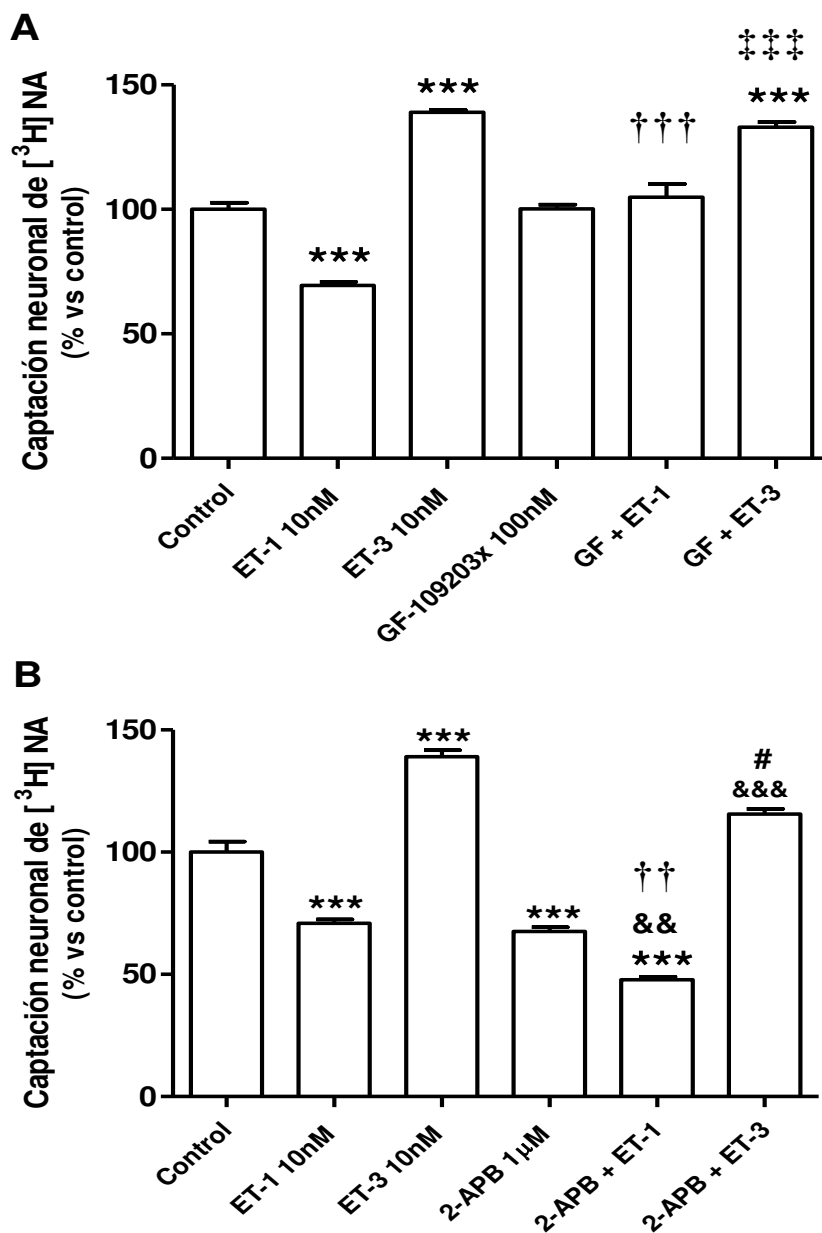


Figura 29: Efectos de ET-1 y ET-3 sobre la captación de NA en presencia de un inhibidor de la PKC (GF-109203x, **A**) y del receptor de IP3 (2-APB, **B**) en HA. Los valores se expresan como % vs el control y representan la media \pm SEM. *** p <0.001 vs control; †† p <0.01 y ††† p <0.001 vs ET-1; ††† p <0.001 vs GF-109203x; # p <0.05 vs ET-3; && p <0.01 y &&& p <0.001 vs 2-APB. Número de experimentos: 6 -7.

HIPOTALAMO POSTERIOR

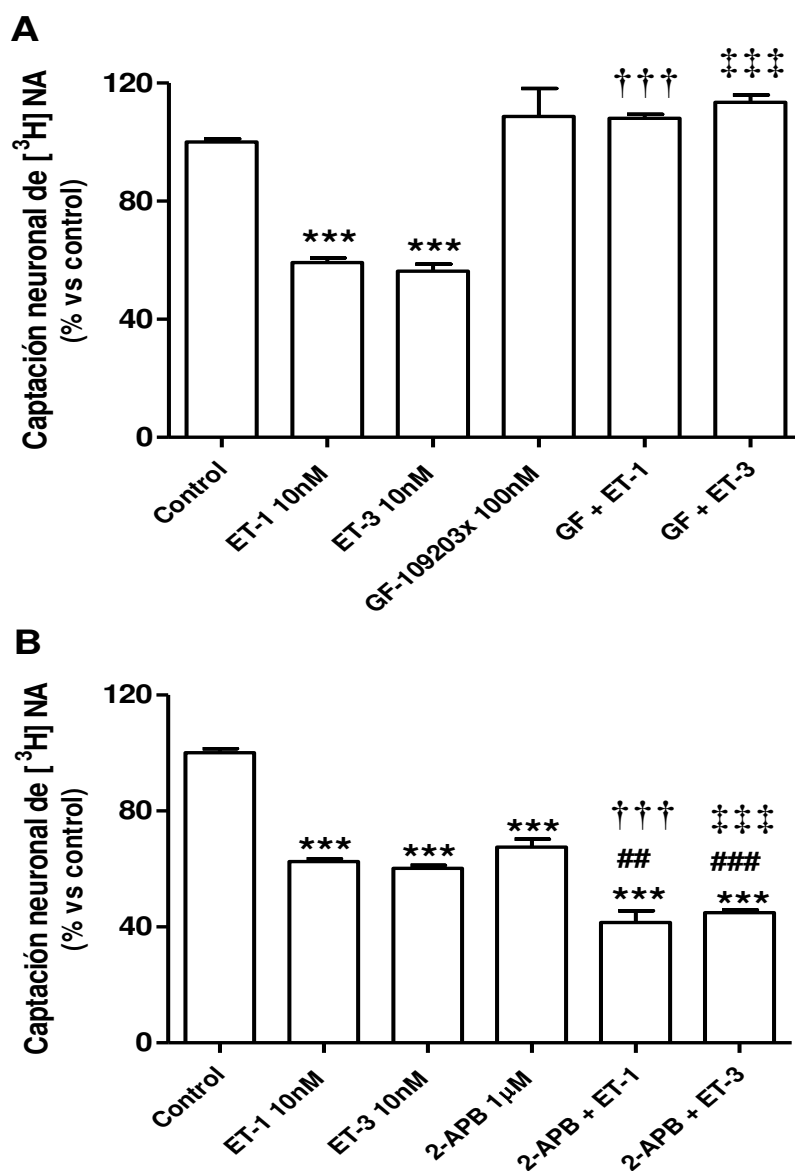
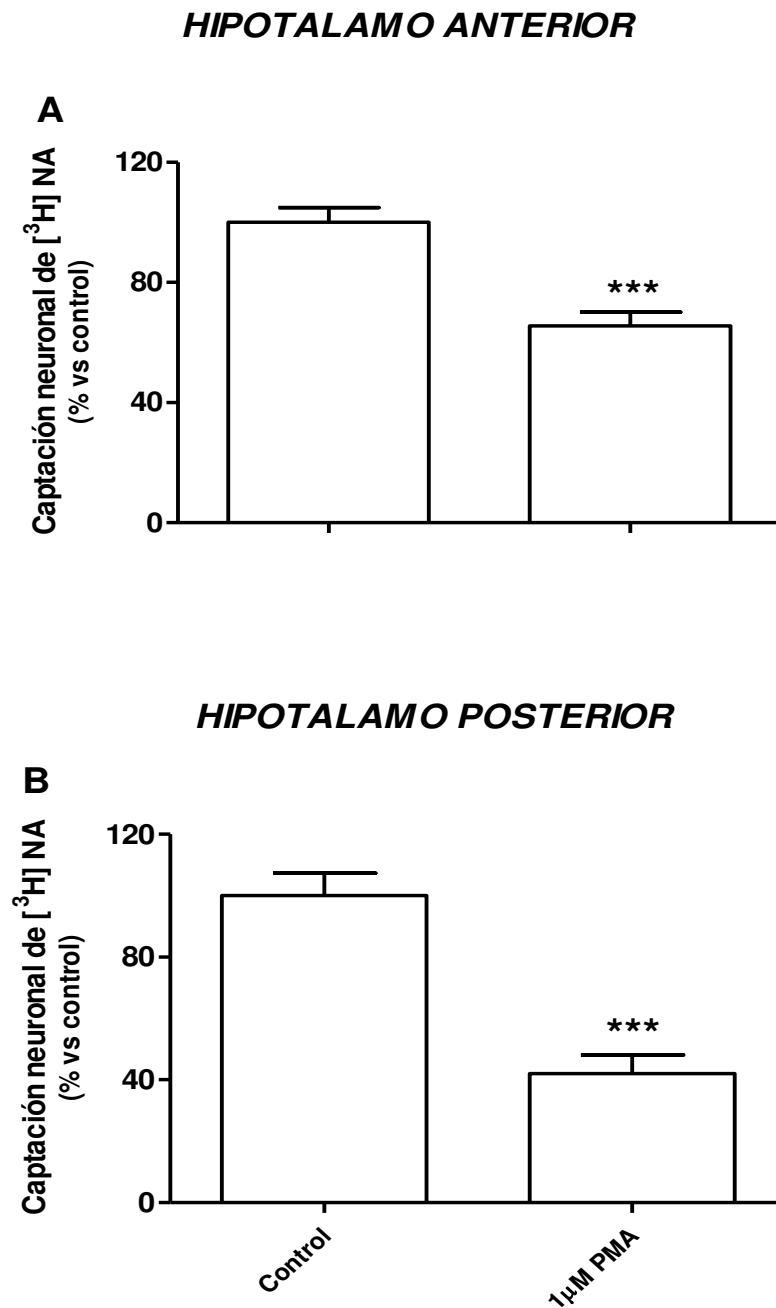


Figura 30: Efectos de ET-1 y ET-3 sobre la captación de NA en presencia de un inhibidor de la PKC (GF109203x, **A**) y del receptor de IP3 (2-APB, **B**) en HP. Los valores se expresan como % vs el control y representan la media \pm SEM. *** p <0.001 vs control; ††† p <0.001 vs ET-1 ††† p <0.001 vs 2-APB; ## p <0.01 y ### p <0.001 vs 2-APB. Número de experimentos: 6 -7.



*Figura 31: Participación de la activación de la PKC (Forbol 12-miristato 13-acetato, PMA) sobre la captación neuronal de NA en el HA y en HP. . Los valores se expresan como % vs el control y representan la media \pm SEM. *** $p < 0.001$ vs control. Número de experimentos: 6 -7.*

- Participación de la vía del AMPc/PKA

En diferentes tejidos así como en células hipofisarias, del epidídimo, del glomérulo y distintos tipos neuronales, las ETs, incrementan la actividad de la adenilato ciclasa lo que aumenta los niveles de AMP_c y la consiguiente estimulación de la PKA (*Opgenorth y col., 1995; Sokolovsky, 1995; Kurokawa y col., 1997; Nambi y col., 1997; Masaki y col., 199; Pérez-Álvarez y col., 2000*). Por otra parte diferentes autores reportaron que la vía del AMPc/PKA actúa regulando la actividad del NET (*Bundey y col., 2000, Bryan-Lluka y col., 2001*). Sobre esta base, el objetivo de presente estudio fue evaluar la participación de la vía PKA/ AMP_c en los efectos de la ETs sobre la captación neuronal de NA en el HA y HP. Para cumplir con este objetivo se realizaron los siguientes grupos experimentales:

- ✓ Control,
- ✓ ET-1 10nM,
- ✓ ET-3 10nM,
- ✓ Inhibidor de la PKA (H-89 500nM)
- ✓ H-89 + ET-1,
- ✓ H-89 + ET-3.

Los resultados obtenidos muestran que el H-89 no muestra efectos *per se* en ninguna de las regiones hipotalámicas estudiadas (Fig 32)

En el HA la disminución de la captación neuronal de NA producida por la ET-1 fue inhibida por el H-89 (Fig 33). Por el contrario, el incremento producido por la ET-3 de la captación 1 de NA no fue modificada por el inhibidor de la PKA (Fig 32).

Por su parte en el HP la reducción de la captación neuronal de NA inducida por ambas ETs fue totalmente bloqueada por el H-89 (Fig 32).

Con el objeto de corroborar que la vía del AMPc/PKA esta involucrada en los efectos inhibitorios sobre la captación 1 de NA producido por la ET-1 y la ET-3, tanto el HA como el HP se incubaron en presencia de un análogo del AMPc (8Br-AMPc) y un activador de la adenilato ciclasa (forskolina, FSK).

Los resultados muestran que tanto en el HA como en el HP el 8Br-AMPC y la FSK disminuyeron significativamente la captación neuronal de NA (Fig 33). Cuando el análogo del AMPc y la FSK son incubados en presencia del inhibidor de la PKA (H-89), la disminución sobre la captación 1 de NA fue bloqueada (Fig 33). Estos resultados demuestran claramente que la disminución de la captación neuronal de NA producida por las ETs son mediadas entre otros mecanismos por la vía del AMPc/PKA.

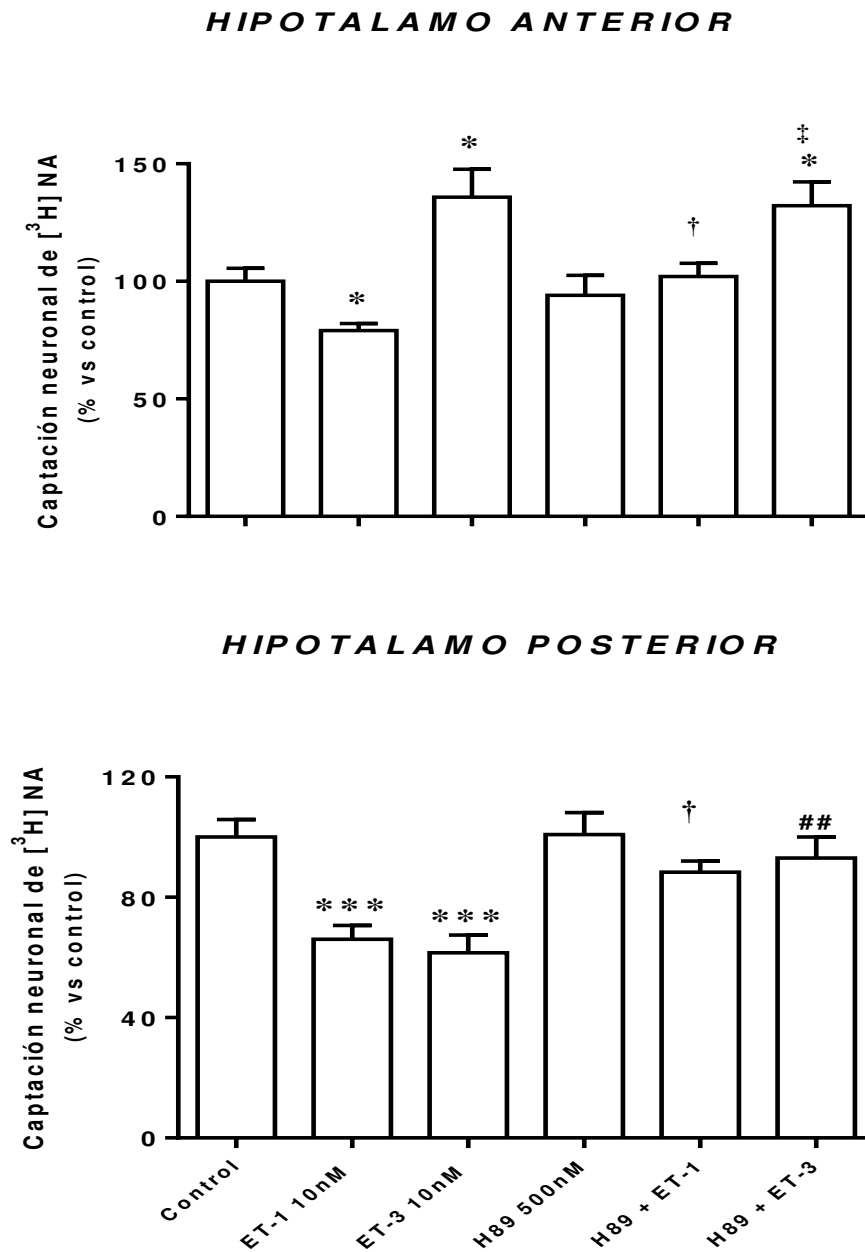


Figura 32 Efectos de ET-1 y ET-3 sobre la captación neuronal de NA en presencia de un inhibidor de la PKA (H89) en HA y en HP. Los valores se expresan como % vs el control y representan la media \pm SEM. * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$ vs control; † $p < 0.05$ vs ET-1; ‡ $p < 0.05$ vs H89; ## $p < 0.01$ vs ET-3 . Número de experimentos: 6 -7.

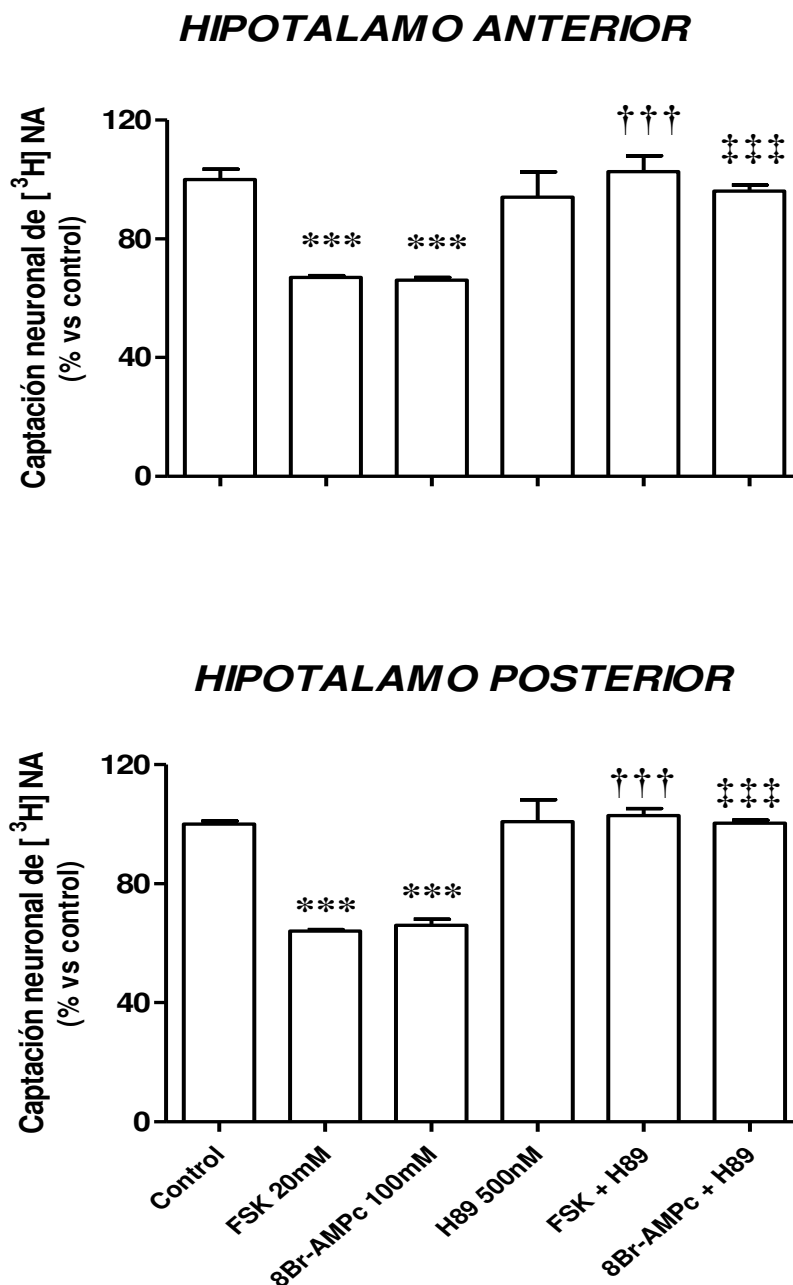


Figura 33: Efectos de un activador de la adenilato ciclasa (FSK) y de un análogo del AMPc (8Br-AMPC) sobre la captación neuronal de NA en el HA y en HP. Los valores se expresan como % vs el control y representan la media \pm SEM. *** $p < 0.001$ vs control; ††† $p < 0.001$ vs FSK; ‡‡‡ $p < 0.001$ vs 8Br-AMPC. Número de experimentos: 6 -7.

- Participación del calcio

Es conocido que las ETs pueden actuar modulando la disponibilidad del Ca^{2+} a expensas de la liberación del mismo desde los depósitos intracelulares como así también del influjo extracelular (Sokolovsky, 1995; Kuwaki y col., 1997 y 1999; Kawanabe y col., 2003; Filosa y col., 2012). La internalización de Ca^{2+} puede deberse a la apertura de canales de Ca^{2+} operados por ligando o por voltaje, que al activarse, permiten el ingreso a la neurona del Ca^{2+} extracelular incrementando su concentración intracelular (Sokolovsky, 1995; Kuwaki y col., 1997; Kuwanabe y col., 2003). La salida de los depósitos se debe a la activación de diferentes tipos de canales ubicados en la membrana del retículo endoplasmático, los receptores específicos a IP_3 y/o los canales intracelulares rianodina sensibles (Verma y col., 1992; Sokolovsky, 1995; Neylon, 1999; Kuwaki y col., 1996; 1997; Carlson y col., 1997; Kuwanabe y col., 2003). Cuando estudiamos previamente, la participación de la vía de los fosfoinosítidos, se determinó el papel de los receptores de IP_3 (Fig 29, 30, y 31)

Por otra parte, diversos estudios demuestran claramente que el calcio está involucrado de la regulación de la captación neuronal de NA (Zahniser y Doolen, 2001; Mandela y Ordway, 2006; Sung y Blakely, 2007).

Con estos antecedentes, se decidió estudiar en HA e HP la participación de los canales rianodina sensitivos (DNT), el calcio extracelular (Medio libre de calcio, CFM) y de la quinasa activada por calcio, la CaMKII (KN62) en los efectos mediados por las ETs sobre la captación neuronal de NA. Con el objeto de llevar a cabo éstos estudios, se realizaron los siguientes grupos experimentales:

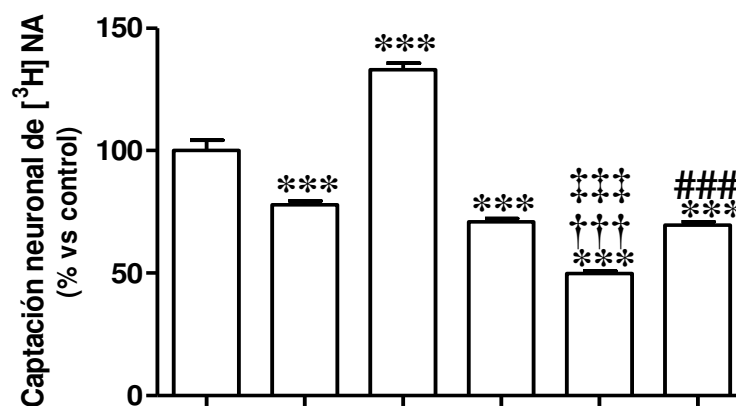
✓ Control	✓ Control,	✓ Control
✓ ET-1 10nM	✓ ET-1 10nM	✓ ET-1 10nM
✓ ET-3 10nM	✓ ET-3 10nM	✓ ET-3 10nM
✓ DNT 50 μ M	✓ Medio sin Calcio (CFM)	✓ KN62 1 μ M
✓ DNT + ET-1	✓ CFM + ET-1	✓ KN62 + ET-1
✓ DNT +ET-3	✓ CFM +ET-3.	✓ KN62 + ET-3

Los resultados muestran que en el HA tanto DNT como el CFM y el KN62 tienen un efecto *per se* disminuyendo significativamente la captación neuronal de NA, circunstancia que se repite en el HP (Fig 34, 35, 36)

En lo que respecta específicamente al HA se observa que en todos los casos la disminución producida por la ET-1 no se inhibió por el bloqueo de los canales rianodina sensitivos (DNT), ni por la incubación en un CFM o en presencia del inhibidor de la CaMKII (KN62) (Fig 34, 35, 36). Por su parte, el incremento producido por la ET-3 sobre la captación 1 de NA se inhibió en todos los estos estudios realizados (Fig 34, 35, 36).

En lo que respecta a los estudios realizados en el HP podemos determinar que la reducción de la captación neuronal de NA producida por ambas ETs no fue afectada por el DNT, CFM y KN62 (Fig 34, 35, 36).

HIPOTALAMO ANTERIOR



HIPOTALAMO POSTERIOR

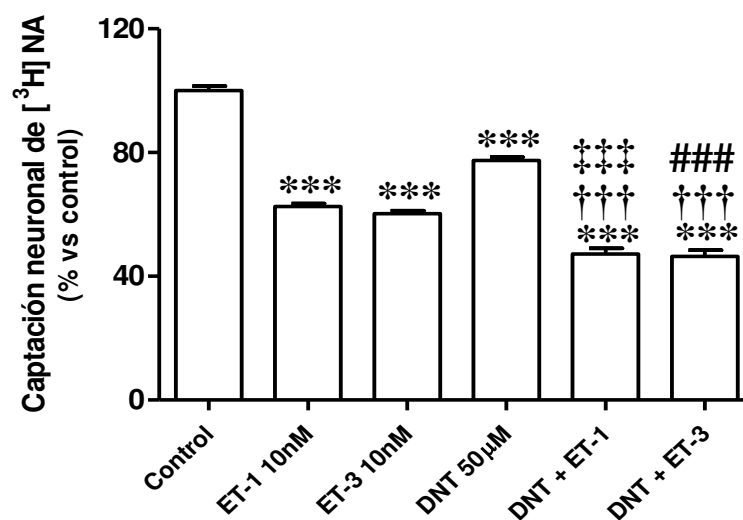
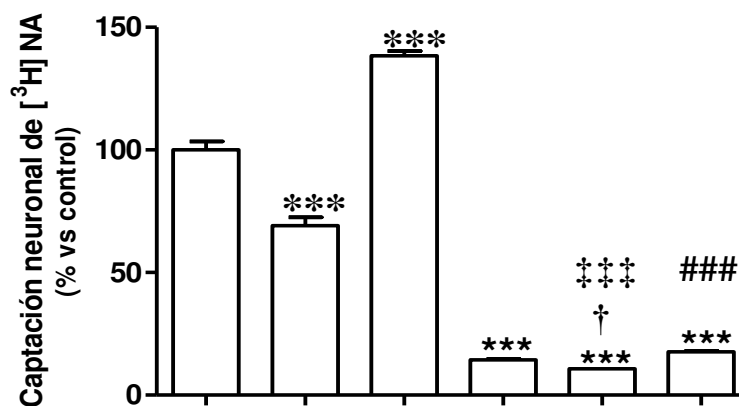


Figura 34 Efectos de ET-1 y ET-3 sobre la captación neuronal de NA en presencia del antagonista de los canales de Ca^{2+} rianodina sensibles (Dantrolene, DNT) en el HA y en HP. Los valores se expresan como % vs el control y representan la media \pm SEM. *** $p < 0.001$ vs control; ††† $p < 0.001$ vs DNT; ### $p < 0.001$ vs ET-1; #### $p < 0.001$ vs ET-3. Número de experimentos: 6-7

HIPOTALAMO ANTERIOR



HIPOTALAMO POSTERIOR

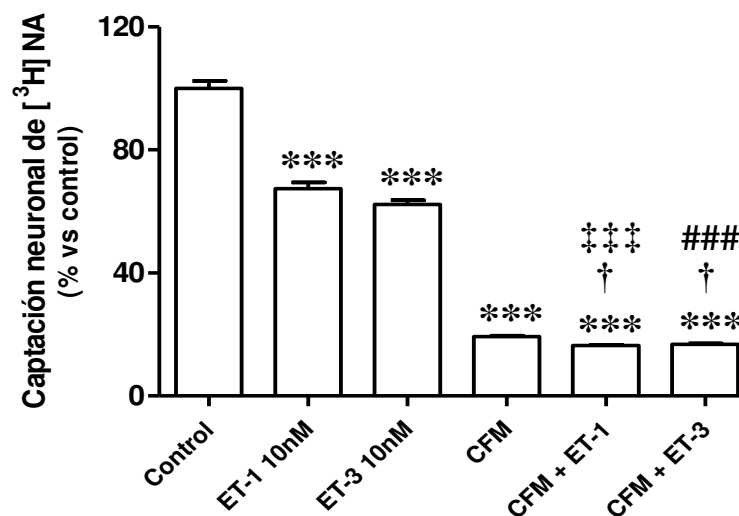
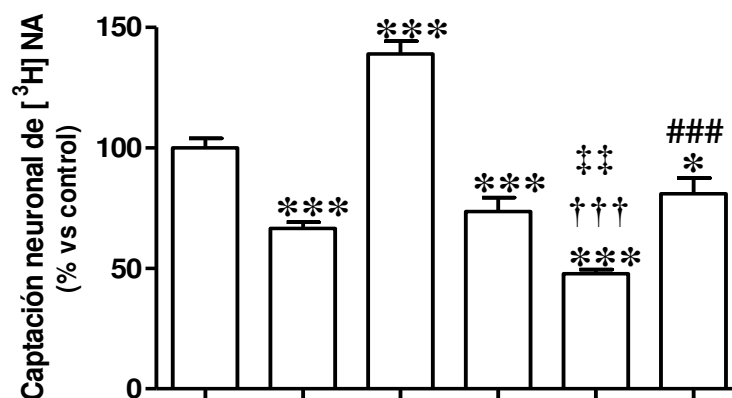


Figura 35 Efectos de ET-1 y ET-3 sobre la captación neuronal de NA en presencia de un medio libre de calcio (CFM) en el HA y en HP. Los valores se expresan como % vs el control y representan la media \pm SEM. *** $p < 0.001$ vs control; † $p < 0.05$ vs CFM; ††† $p < 0.001$ vs ET-1; ††† $p < 0.001$ vs ET-3. Número de experimentos: 6-7

HIPOTALAMO ANTERIOR



HIPOTALAMO POSTERIOR

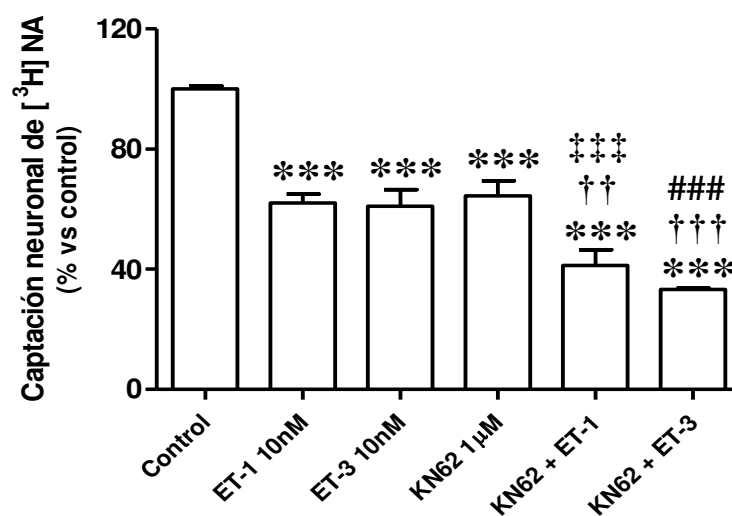


Figura 36: Efectos de ET-1 y ET-3 sobre la captación neuronal de NA en presencia del inhibidor de la CaMKII, (KN62) en el HA y en HP. Los valores se expresan como % vs el control y representan la media \pm SEM. * p <0.05 y *** p <0.001 vs control; †† p <0.01 y ††† p <0.001 vs KN62; †† p <0.01 y ††† p <0.001 vs ET-1; ††† p <0.001 vs ET-3. Número de experimentos: 6 -7

4.2- Estudio del mecanismo de internalización del NET

4.2.1- Estudio de los efectos de las ETs sobre la unión de Nisoxetina

El proceso de internalización del NET es uno de los mecanismos más importantes a través de los que se regula la expresión del transportador en la membrana de la terminal noradrenérgica. Con el objeto de estudiar si las ETs alteran la distribución del NET entre la membrana plasmática y los depósitos intracelulares, realizamos la determinación del binding de [³H]-NSX (*Tejani-Butt, 1992; Blakely y Bauman, 2000; Zahniser y Doolen, 2001; Bönisch y Brüss, 2006*) y calculamos las constantes de disociación K_d y B_{max} o unión de ligando a la membrana (máximo número de transportadores en la membrana). Se usa la NSX tritiada debido a que es entre 400 a 1000 veces más afín por el NET que por el DAT y el SERT (*Tejani-Butt, 1992; Blakely y Bauman, 2000; Zahniser y Doolen, 2001; Bönisch y Brüss, 2006; Mandela y Ordway, 2006; Ramamoorthy y col., 2011; Haenisch y Bönisch, 2011*), permitiendo de esta manera una mayor selectividad en estos experimentos. Para este estudio se realizaron los siguientes grupos experimentales:

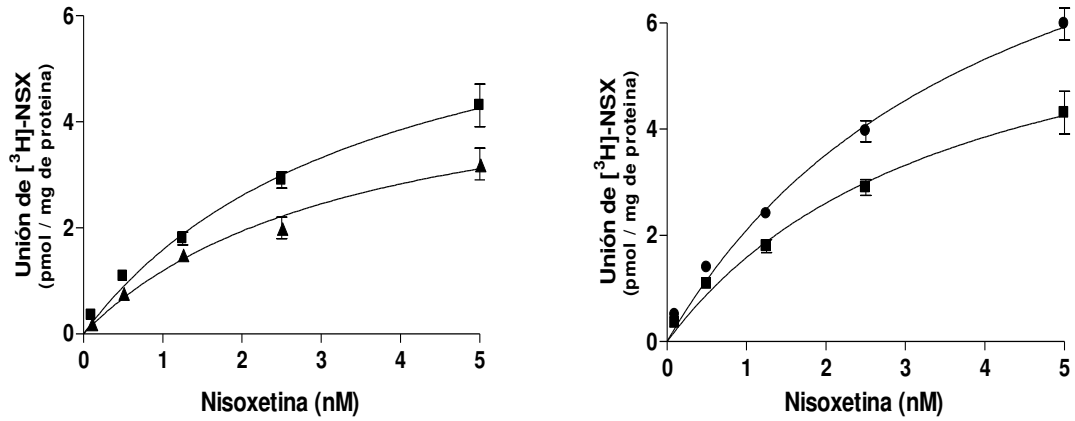
- Control
- ET-1 10nM
- ET-3 10nM

Los resultados mostraron que en el HA la ET-1 disminuye la B_{max} de NSX, mientras la ET-3 la incrementan, sin embargo ambas no modifican la constante de disociación (K_d) (*Fig 37, Tabla VI*).

Por su parte en el HP ambas ETs redujeron la B_{max} sin afectar la K_d de NSX (*Fig 37, Tabla VI*).

Estos resultados muestran que la ET-1 en el HA y ambas ETs en el HP inducen la internalización del NET y que la ET-3 en el HA aumentan la expresión del transportador en la membrana. Estos datos explican claramente los efectos observados por las ETs sobre la captación neuronal de NA en las diferentes regiones hipotalámicas estudiadas.

HIPOTALAMO ANTERIOR



HIPOTALAMO POSTERIOR

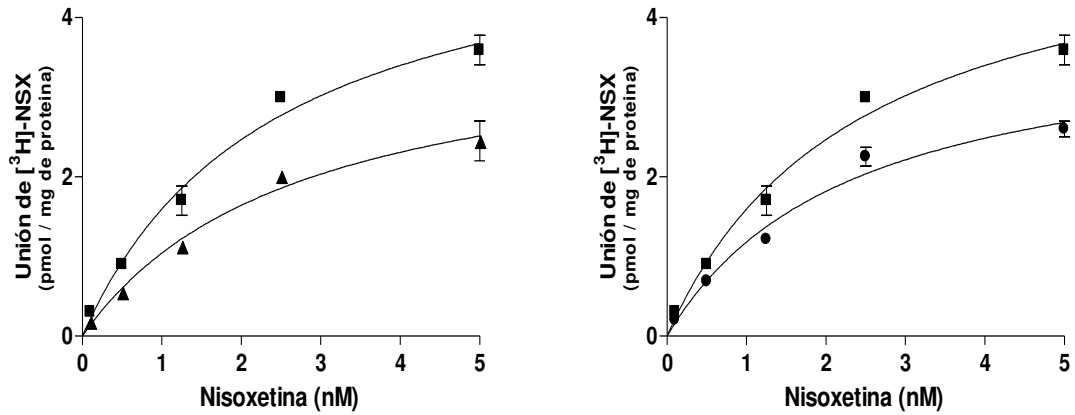


Figura 3Z: Efectos de ET-1 y ET-3 sobre la unión de nisoxetina (NSX) en el HA y en HP. Los valores representan la media \pm SEM de tres experimentos realizados por triplicado. ■: Control; ▲: ET-1 10nM y ● ET-3 10nM.

Tabla VI: Efectos de ET-1 y ET-3 sobre Kd (nM) y Bmax (pmol / mg de proteína). Los parámetros fueron obtenidos de la curva de unión de nisoxetina (Figura 37) mediante el análisis de regresión no lineal. *p<0.05 vs Control.

Hipotálamo Anterior

	Control	ET-1 10nM	ET-3 10nM
Kd (nM)	3.7 ± 0.8	3.4 ± 1.0	4.2 ± 0.9
Bmax (pmol / mg de proteína)	7.4 ± 0.6	5.2 ± 0.5*	10.9 ± 1.0*

Hipotálamo Posterior

	Control	ET-1 10nM	ET-3 10nM
Kd (nM)	2.4 ± 0.6	2.7 ± 0.7	2.3 ± 0.7
Bmax (pmol / mg de proteína)	5.5 ± 0.5	3.8 ± 0.3*	3.9 ± 0.2*

4.2.2- Determinación de los mecanismos intracelulares involucrados.

Ya se determinó previamente los efectos de las ETs sobre el proceso de internalización del NET, en ese ítem de la tesis se analizó las vías intracelulares involucradas en el proceso de internalización y su correlación con los estudios realizados previamente sobre el mecanismo de captación neuronal de NA. Pero existe una redistribución en la superficie celular después de la estimulación de los transportadores tales como DAT, SERT, GAT y el propio NET (Qian y col., 1997; Beckman y col., 1999; Ramamoorthy y Blakely, 1999; Saunders y col., 2000, Apparsundaram., 2001), la que es mediada por diferentes vías intracelulares. De esto surge que la función catalítica del NET está regulada por múltiples mecanismos que involucran diferentes quinasas. y de esta manera se modula intrínsecamente la capacidad de remoción de la NA (Apparsundaram y col., 1998; Apparsundaram., 2001; Gadea y col., 2002; Turetta y col., 2002, Jayanthi y col., 2004; 2005; Sung y Blackely, 2007, Kristensen y col., 2011).

Por lo tanto, sobre estas bases, con el objeto de estudiar las quinasas involucradas en el proceso de internalización del NET se realizó la determinación de la unión de [³H]-NSX en presencia de inhibidores de diferentes vías intracelulares anteriormente estudiadas en el mecanismo de captación neuronal de NA.

Para el presente estudio se realizaron los siguientes grupos experimentales:

- ✓ Control,
- ✓ ET-1 10 nM
- ✓ ET-3 10 nM
- ✓ Inhibidor (7-NI 10μM, KT-5823 2μM, GF-109203x 100nM, KN- 62 2μM o H-89 500nM)
- ✓ Inhibidor + ET-1
- ✓ Inhibidor + ET-3

El estudio de la vía del NO mostró que ni el inhibidor de la NOS neuronal (7-NI) inhibidor de la PKG (KT-5823) mostraron efecto *per se* sobre la unión de NSX tanto en el HA como en el HP (Fig 38). En lo que respecta al HA, el 7-NI inhibió la reducción de la unión de NSX producida por ET-1, sin afectar el incremento inducido por ET-3 (Fig 38). Por su parte en el HP, el inhibidor de la NOS neuronal revirtió la reducción producida por ambas ETs(Fig 38).

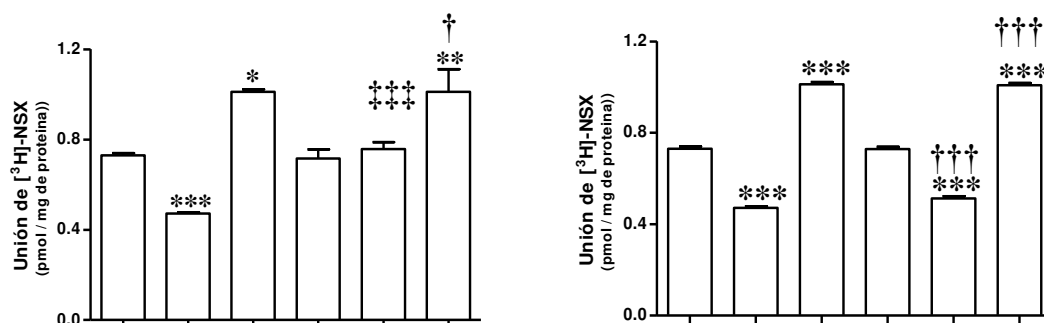
Cuando analizamos la participación de la PKC en este proceso, observamos en primera medida que el inhibidor, GF-109203x, no mostro acciones *per se* sobre la unión de NSX en HA e HP (Fig 39). Por su parte, la inhibición de la PKC revirtió los efectos producidos por la ET-1 en HA y

por ambas ETs en HP, sin afectar la estimulación producida por ET3 sobre la unión de NSX en el HA (Fig 39).

Por su parte, la inhibición de la PKA con H-89 no mostro efectos *per se* sobre la unión a NSX en ninguna de las regiones hipotalámicas estudiadas (Fig 40). Cuando los tejidos tratados con el inhibidor de la PKA fueron incubados con las ETs se observó que en el H-89 inhibió la reducción de la unión de NSX producido por la ET-1 en HA e HP y de la ET-3 en el HP (Fig 40). Sin embargo el H-89 no modificó la estimulación de la unión de NSX producida por ET-3 en HA(Fig 40).

En lo que respecta a la CaMKII, los resultados muestran que el inhibidor de esta quinasa, el KN-62, produce una reducción significativa de la unión de NSX en ambas regiones hipotalámicas estudiadas (Fig 41). Por su parte cuando el HA y el HP se incubaron con el KN-62, este reduce significativamente todos los efectos producidos por las ETs sobre la unión de NSX, tanto en el HA como en el HP (Fig 41).

HIPOTALAMO ANTERIOR



HIPOTALAMO POSTERIOR

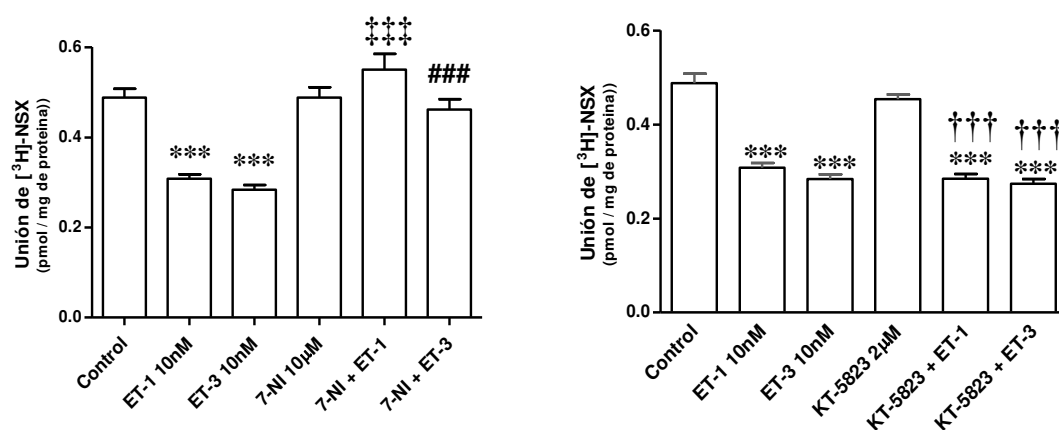


Figura 38: Efectos de ET-1 y ET-3 sobre la unión a nisoquetina (NSX) en presencia de un inhibidor de la NOS neuronal (7-NI) y de la PKG (KT-5823) en el HA y en HP. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ vs Control; † $p < 0.05$ y ††† $p < 0.001$ vs inhibidor (7-NI o KT-5823); ### $p < 0.001$ vs ET-1; ### $p > 0.001$ vs ET-3. Los valores representan la media \pm SEM de tres experimentos realizados por triplicado.

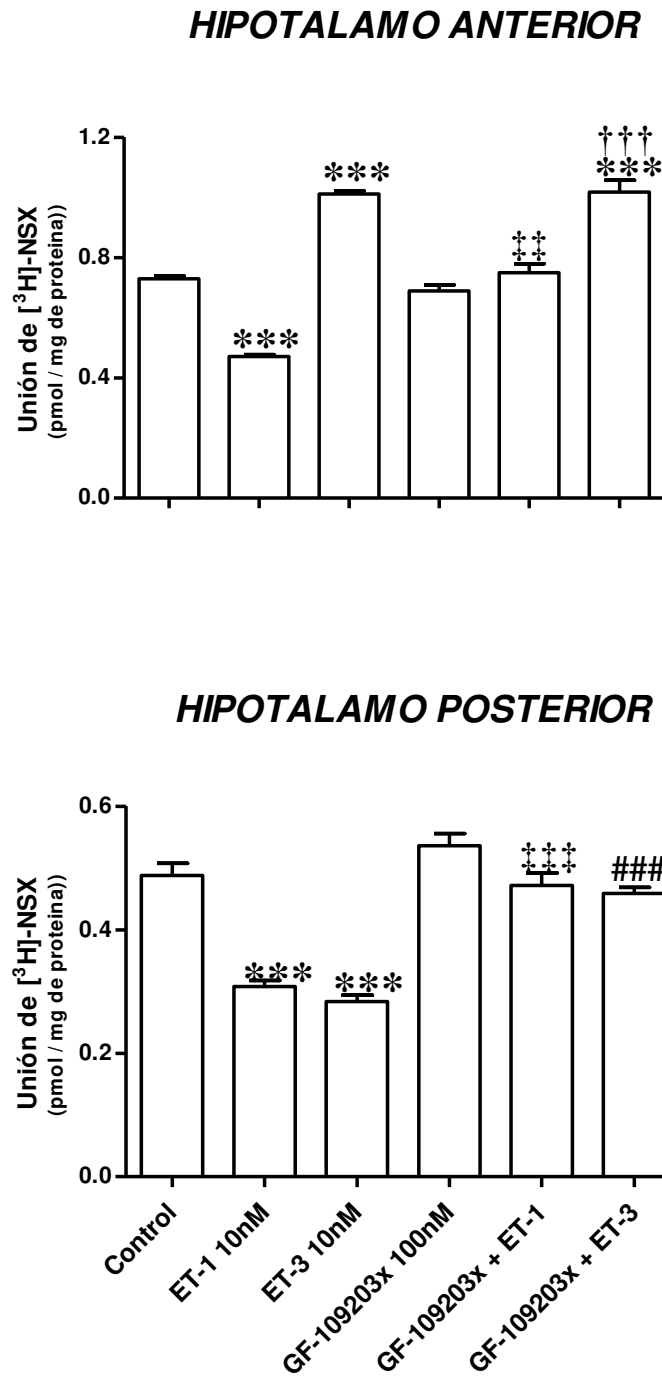


Figura 39: Efectos de ET-1 y ET-3 sobre la unión a nisoxetina (NSX) en presencia de un inhibidor de la PKC (GF-109203x) en el HA y en HP. *** $p < 0.001$ vs Control; ††† $p < 0.001$ vs GF-109203x; †† $p < 0.01$ y ††† $p < 0.001$ vs ET-1; ### $p > 0.001$ vs ET-3. Los valores representan la media \pm SEM de tres experimentos realizados por triplicado.

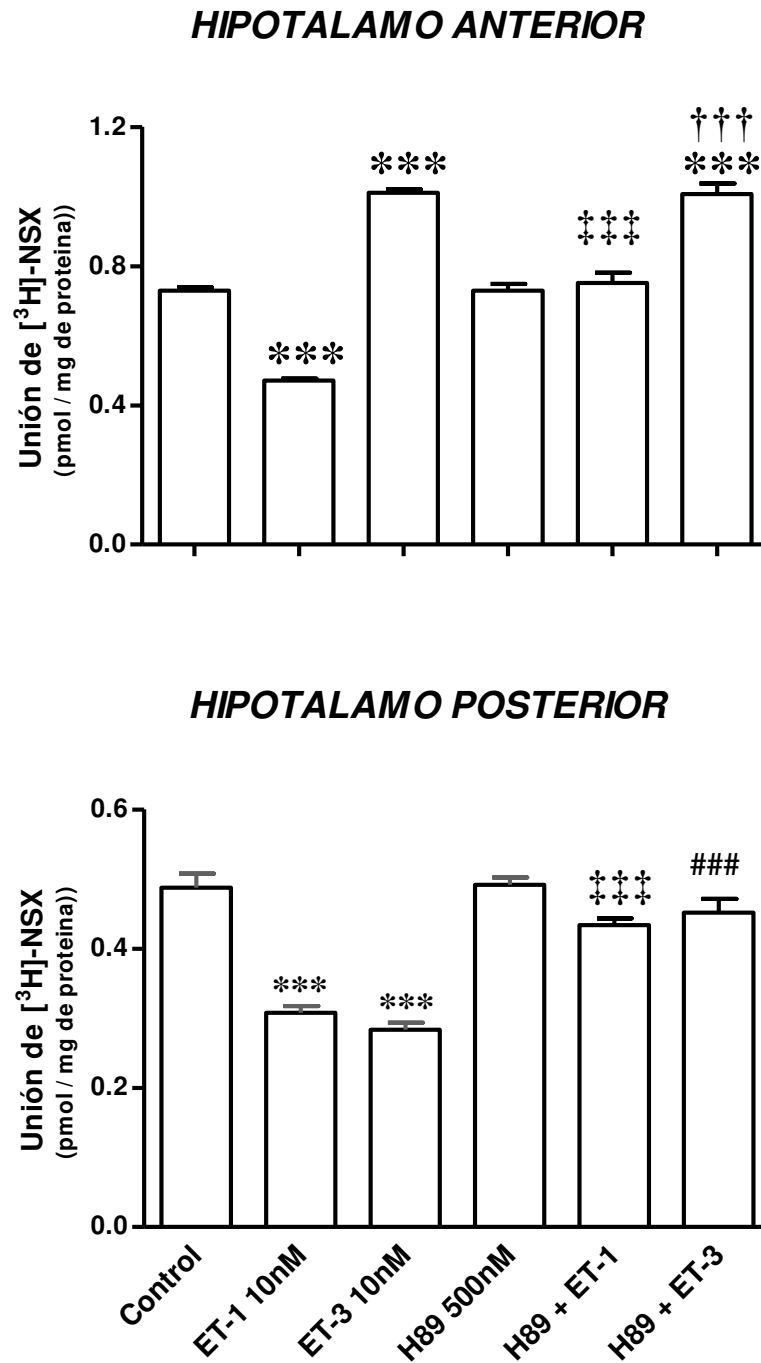


Figura 40: Efectos de ET-1 y ET-3 sobre la unión a nisoxetina (NSX) en presencia de un inhibidor de la PKA (H89) en el HA y en HP. *** $p < 0.001$ vs Control ; ††† $p < 0.001$ vs H89 ; ††† $p < 0.001$ vs ET-1 ; ### $p > 0.001$ vs ET-3. Los valores representan la media \pm SEM de tres experimentos realizados por triplicado.

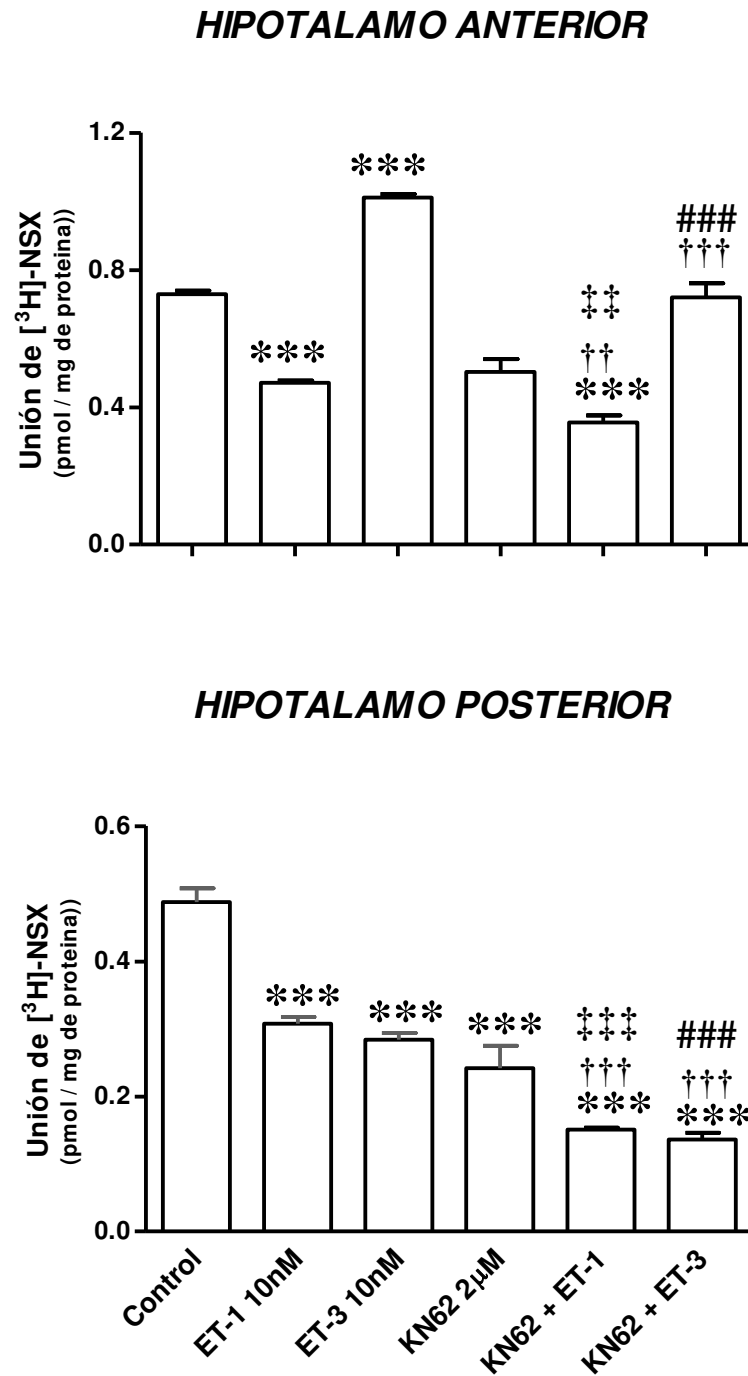


Figura 41 Efectos de ET-1 y ET-3 sobre la unión a nisoxetina (NSX) en presencia de un inhibidor de la CaMKII (KN62) en el Ha y en HP. *** $p < 0.001$ vs Control; †† $p < 0.01$ y ††† $p < 0.001$ vs KN62; ‡‡ $p < 0.01$ y ‡‡‡ $p < 0.001$ vs ET-1; ### $p > 0.001$ vs ET-3. Los valores representan la media \pm SEM de tres experimentos realizados por triplicado.

5-Discusión

El término neuropéptido se aplica a aquellas moléculas transmisoras relativamente grandes, compuestas por 3 a 36 aminoácidos. Son sintetizadas tanto en el SNC como en el sistema nervioso periférico y son capaces de modular la función neuronal (*Hukfelt y col, 2004; Hukfelt y col, 2000; Mains y col, 2006*). Entre las familias de neuropéptidos más conocidas y relacionadas con la regulación de la función cardiovascular se encuentran: las angiotensinas, la calicreína-cinina, la oxitocina, los péptidos natriuréticos y las ETs entre otras tantas (*Haynes y Webb, 1998; AbdAlla y col., 2005; Szczepańska-Sadowska, 2006; Higa-Taniguchi y col., 2007; Duchene y col., 2009, Vatta y col, 2009*).

Los neuropéptidos, también llamados neurotransmisores de alto peso molecular, pueden co-localizarse en las mismas neuronas y sinapsis que los neurotransmisores clásicos o de molécula pequeña, llevando información entre neuronas y regular así la eficacia en la comunicación neuronal (*Hokfelt y col., 1980; Merighi y col., 2002*).

A diferencia de los neurotransmisores de molécula pequeña o clásicos que son sintetizados en la terminal axónica, los neuropéptidos se producen en el soma neuronal, las vesículas secretoras llenas de péptido son transportadas a lo largo del axón por un transporte axonal rápido hasta la terminal axónica (*Shakiryanova y col., 2005; Levitan y col., 2008*).

El proceso de síntesis de los neuropéptidos es muy dinámico debido a que puede ajustarse fácilmente a la actividad de todas aquellas neuronas en las que están operando (*Hokfelt y col., 2000; 2004*). A largo plazo, éstos péptidos pueden sufrir procesos de adaptación debido a cambios prolongados del medio en el que se encuentran (*Barakat y col., 2006 a y b*). En cuanto a su inactivación, al no haberse encontrado sistemas de transporte de membrana efectivos, parece que ésta se lleva a cabo por medio de la acción de las peptidasas activas que se encuentran en el espacio sináptico en donde son liberados. Por tanto, no son recaptados ni reciclados por la neurona, por lo que se deduce que la cantidad de neuropéptido que se libera, solo va a depender de la concentración que se encuentre almacenada en las vesículas que los contiene. Por su parte, los procesos de degradación enzimática de los neuropéptidos son más lentos que los de los neurotransmisores clásicos, lo que implica que tienen un mayor tiempo de biodisponibilidad en el

espacio sináptico para actuar sobre sus receptores (*Szczepańska-Sadowska, 2006, Levitan y col., 2008*).

Los neuropéptidos actuarían como neuromoduladores afectando tanto a neuronas como a células gliales ya que sus receptores se localizan en ambos tipos celulares (*Hokfelt y col., 2000, 2003; Latsari y col., 2002; Mechawar y col., 2002; Descarries y col., 2004*). Dichos neuropéptidos están involucrados en la regulación de circuitos neuronales relacionados controlando funciones vitales tales como el aprendizaje y consolidación de la memoria, procesos cognitivos y emocionales, regulación de la temperatura corporal, sed, apetito, ingesta, metabolismo, secreción de neurohormonas hipotálamicas así como también la modulación de la función cardiovascular y respiratoria (*Oparil y col., 1995; Wyss y col., 2001; Dampney y col., 2005; Guyenet y col., 2006; Kumar y col., 2007; García-Segura y col., 2008; Hill y col., 2008; Morrison y col., 2008; Plant, 2008; Pfaff y col., 2008*).

La importancia del estudio de los diferentes neuropéptidos radica en que aparentemente durante varios estados y procesos patológicos se produce una modulación (estimulación o inhibición) intensa y prolongada de los mismos como en las adicciones, enfermedades cardiovasculares, desordenes en el balance de energía o hidrosalino, entre otros (*Szczepańska-Sadowska, 2006; de Lecea y col., 2006; Penna y col., 2006; Meister, 2007; Schiffrin, 2007; Boutrel, 2008; Cottrell y col., 2009*).

Sobre la base de todos los antecedentes discutidos previamente, en el presente trabajo de Tesis Doctoral se planteó determinar los efectos de la ET-1 y ET-3 sobre el principal mecanismo de inactivación de la NA, la recaptación neuronal del neurotransmisor.

Los somas de las neuronas noradrenérgicas están localizadas fundamentalmente en las regiones A1-A7 y proyectan a diferentes regiones del SNC tales como los bulbos olfatorios, corteza, amígdala, hipotálamo (HA e HP), hipocampo y septum (*Footes y col., 1983*). Por otra parte, la NA se libera en estas diferentes regiones pero, sin embargo, los mecanismos que regulan su concentración en el espacio sináptico son región específica. Prueba de lo último es que se observó variaciones regionales de la concentración de NA en terminales noradrenérgicas de diferentes áreas de la corteza tales como la prefrontal, somatosensorial y corteza visual (*Brown y col., 1979; Levitt y col., 1984*). Estas diferencias pueden deberse no solo a los mecanismos regulatorios que modulan la captación sino también a posibles variaciones intrínsecas del propio

transportador. Por tanto, los estudios se focalizaron sobre el efector de la regulación del neurotransmisor, el transportador de NA, que se encuentra presente tanto en el HA como en el HP, las cuales están íntimamente relacionadas al control de presión arterial. Este abordaje de la investigación se debe a que, a pesar de todos los antecedentes antes mencionados, en la actualidad aún no se encuentran bien definidos los mecanismos de la interacción ETs-transmisión noradrenérgica, de esta manera, el cabal conocimiento de cómo funciona este mecanismo permitirá comprender su posible implicancia en la fisiología y patología cardiovascular.

Es importante señalar que solo se estudiaron la isoforma ET-1 y la ET-3 por ser consideradas neuromoduladores o neurotransmisores putativos (Naidoo y col., 2004, Braash y col., 2009, Braash y Scharf, 2014). Esto se basa en la definición de neuromodulador que afirma que se denomina así a toda sustancia de origen celular o neuronal capaz de afectar la excitabilidad o performance de las neuronas a través de acciones producidas por fuera de la región sináptica (Florey, 1967). En éste sentido existen diversos antecedentes que demostraron que las ETs actúan regulando la síntesis y liberación de diferentes sustancias que actúan como neurotransmisores (Stojilkovic, 1996; van den Buuse y Webber, 2000; García-Segura y col., 2008; Hill y col., 2008; Morrison y col., 2008; Plant, 2008, Watts S, 2010). Así se observa que la ET-1 incrementa la liberación de dopamina en el núcleo estriado de rata, mientras que la ET-3 estimula la exocitosis catecolaminérgica en partes de corteza (Koizumi y col., 1997; van de Buuse y col., 2000). También se demostró que los neuropéptidos están involucrados, en la regulación de circuitos neuronales que están relacionados con el control de funciones tales como secreción de neurohormonas hipotalámicas, así como también la modulación de la función cardiovascular y respiratoria, entre otras funciones vitales (Wyss y col., 2001; Dampney y col., 2005; Guyenet y col., 2006. Kumar y col., 2007; García-Segura y col., 2008; Morrison y col., 2008; Plant, 2008).

El primer paso fue estudiar la actividad del NET determinando los efectos *ex vivo* de de diferentes concentraciones de ETs, de tal manera de hallar la concentración efectiva de ETs sobre la captación. Para la elección de los rangos de la curva concentración-respuesta tuvimos en cuenta que postulamos en nuestra hipótesis que las ETs se comportarían como neuropéptido modulador, por lo que elegimos trabajar con un intervalo de concentración que incluya al rango de acción de un neuropéptido. Además se tuvo en cuenta que la concentración de las ETs en el líquido cerebroespinal de la rata y otros mamíferos es de aproximadamente 0.1 – 16 pM para ET-

1 (Hirata y col., 1993; Ehrenreich y col., 1992; Moqueda- García y col., 1993) y 0.1 – 33 pM para ET-3 (Togashi y col., 1990; Yamaji y col., 1990); concentraciones que también fueron incluidas en el rango de estudio. De acuerdo a los resultados obtenidos en las curvas concentración-respuesta podemos afirmar que los efectos de las ETs son no solo concentración dependientes, sino que estas coinciden con el rango de concentraciones a las que los neuropéptidos producen efectos biológicos y que corresponde al rango de fmol/l y pmol/l (Hirata y col., 1990; Shirakami y col., 1990; Suzuki y col., 1990a, 1990b; Togashi y col., 1990; Yamaji y col., 1990; Ando y col., 1991; Kraus y col., 1991; Ando y col., 1991; Ehrenreich y col., 1992; Ehrenreich y col., 1992; Moqueda-García y col., 1993). Además, estos rangos de concentración coinciden con las concentraciones fisiológicas de las ETs en el hipotálamo y otras regiones del SNC, la cual se encuentra en el orden de ng/mg proteína (Ehrenreich y col., 1992; Sokolovsky 1992; Moqueda- García y col., 1993; Kuwaki y col., 1997y 1999). De las mencionadas curvas elegimos como concentración de trabajo para ambos péptidos la concentración de 10 nM. Ésta concentración coincide no solo con las utilizadas por otros trabajos (Yamamoto y col., 1993, Hoang y col., 2001, Oishi y col., 2002), sino que también con la usada por nuestro grupo de trabajo para evaluar los efectos de las ETs sobre otros pasos de la transmisión noradrenérgica tanto en ratas normales como hipertensas (di Nunzio y col., 2002, 2004; Morgazo y col., 2005; Perfume y col., 2007, 2008; Nabhen y col., 2009, 2011; Abramoff y col., 2015)

Por otra parte, es bien conocido que la captación tanto neuronal o captación 1 como la extraneuronal o captación 2 de NA constituyen mecanismos que regulan la disponibilidad del neurotransmisor en el espacio sináptico (Ibersen, 2006 Torres y Amara, 2007, Kristensen y col., 2011). Sin embargo la captación neuronal de NA es el mecanismo más importante a través del cual se regula la concentración de la amina en el espacio sináptico (Ibersen, 2006 Torres y Amara, 2007, Kristensen y col., 2011, Ramamoorthy y col., 2011). La trascendencia de este mecanismo lo hace blanco para la regulación por diversas sustancias tales como neuromoduladores (angiotensina, péptidos natriuréticos, bradiquinina, etc) tanto en situaciones normales como en diversos estados patológicos tales como la hipertensión arterial, depresión, etc (Oparil y col., 1995; Watson y col., 2002; Guyenet y col., 2006; Duale y col., 2007; Kasparov y Teschemacher, 2008). Sobre ésta base y luego de determinar la concentración de trabajo, una de las siguientes preguntas a responder era definir si las ETs actuaban sobre la captación neuronal y/o

extraneuronal de la NA. En primera instancia observamos que ambas ETs no tienen efecto sobre la captación extraneuronal (HC sensitiva) y si afectan la captación neuronal (DMI sensitiva). Este proceso se lleva a cabo por al menos tres transportadores, uno es el transportador clásico de monoaminas extra-neuronal corticosterona-sensibles (EMT) y los otros son los denominados Transportadores de cationes orgánicos (OCTs: OCT1 y OCT2) (*Eisenhofer, 2001*) los que se encuentran localizados en estructuras extraneuronales como la glía, músculo liso, cardíaco, tejido glandular o conectivo, etc, y además este mecanismo se encuentra acoplado a la degradación por la COMT (*Eisenhofer, 2001; Ramamoorthy y col., 2011*). Éstos tres transportadores no neuronales son sensibles a la corticosterona, hidrocortisona (HC) e isocianinas y el EMT además al O-metil-isoprenalina (*Eisenhofer, 2001*). Además y como quedó demostrado, la captación no neuronal no solo es cuantitativamente menor, sino que también es de baja afinidad y no estereoselectiva, presentando mayor actividad para la adrenalina que para la NA (*Eisenhofer, 2001*). Por su parte la captación neuronal de NA en un proceso caracterizado por tener alta eficiencia, estereoselectividad y ser saturable y es mediado por el NET (*Blakely, 2005, Mandela y Ordway, 2006, Torres y Amara, 2007*). Éste transportador es dependiente no solo del Na^+ y Cl^- , sino que también de la energía y la temperatura (*Blakely, 2005, Ibersen, 2006; Hahn y Blakely, 2007*). La actividad del NET es selectivamente bloqueada por drogas como los antidepresivos tricíclicos y la cocaína (*Blakely, 2005, Ibersen, 2006; Torres y Amara, 2007*). Este transportador presenta una energía electroquímica, para la translocación al espacio intraneuronal de la NA, que se genera por un gradiente de Na^+ (*Bönish y Brüss, 2006*). La captación neuronal de NA es un proceso fundamental en la regulación de la disponibilidad del neurotransmisor en el espacio sináptico y también juega un papel importante en la regulación de la homeostásis a nivel de la pre y post-sinapsis (*Blakely y col., 1994; Eisenhofer, 2001; Bönish y Brüss, 2006; Mandela y Ordway, 2006*). Por lo tanto, de estos resultados se puede afirmar que tanto la ET-1 como la ET-3 modulan específicamente la captación neuronal de NA sin observarse efectos sobre la captación no neuronal.

El siguiente paso fue investigar la evolución temporal de los efectos de las ETs sobre la captación neuronal. Las modificaciones producidas por las ETs a lo largo de los distintos tiempos estudiados (5, 10, 15, 30 y 60 minutos) siguen la tendencia observada en ambas hemiporciones hipotalámicas. Observamos que en el HA la ET-1 disminuye la captación neuronal de NA en todos

los tiempos estudiados mientras que la ET-3 la incrementa. Por su parte, en el HP ambas ETs disminuyen el uptake 1 de NA en todos los tiempos estudiados. Como fue demostrado por nuestro laboratorio, el comportamiento de hipérbola en donde se puede observar que la pendiente, que corresponde a la captación neuronal propiamente dicha se produce hasta los 10 a 15 minutos aproximadamente en donde la curva comienza a presentar un plateau y que corresponde a un proceso llamado por algunos investigadores acumulación (Vatta y col., 1996). Por esta razón es que se trabajó a 5 minutos de incubación debido a que en éste intervalo de tiempo es el que está descrito en la bibliografía que corresponde a la captación neuronal de NA propiamente dicha (Fernández y col., 1990; Vatta y col., 1990; 1996; Papouchado y col., 1995).

Debido a que las modificaciones de la actividad de la NET producidas por las ETs podrían deberse a cambios en los parámetros cinéticos, como se observa en todo mecanismo de transporte, se realizó el estudio cinético del transportador. El objetivo fue verificar que la acción de las ETs se produce sobre los procesos dinámicos de reciclaje, afinidad y down o up-regulation del NET (Blakely y Bauman, 2000; Zahniser y Doolen, 2001; Bönisch y Brüss, 2006; Mandela y Ordway, 2006; Sung y Blackely, 2007; Kasparov y Teschemacher, 2008; Song y col, 2008; Ramamoorthy y col., 2011). Mediante el mencionado estudio cinético se determinaron los parámetros de la captación neuronal de ^3H NA. Por un lado, se determinó la V_{max} , la que es directamente proporcional a la capacidad de transporte, y por otro lado se determinó la constante de afinidad del NET a la NA (K_m). Los estudios mostraron que en el HA la ET-1 disminuye la V_{max} (38.0 %), sin modificar K_m , es decir que no se modifica la afinidad del NET a la NA pero disminuye la concentración de transportadores expresados en la membrana. Lo mismo ocurre en HP, la ET-1 y ET-3 disminuyeron la V_{max} (33.0 – 34.0 % respectivamente), sin que se modifique la K_m . Por su parte, en el HA, la ET-3 incrementó en un 36% el V_{max} , sin que se observen cambios significativos en la K_m . Es decir que ET-3 incrementa la captación neuronal de NA por aumento de la actividad del NET como consecuencia, probablemente, de un mayor número de transportadores expresados en la membrana los que permite que mayor número de neurotransmisor se una y pueda ser internalizado. También evaluamos la eficiencia catalítica de translocación del transportador mediante el cálculo de la relación V_{max}/K_m (Graefe y Bönisch, 1988; Bönisch y Brüss, 2006). Se observó que ET-1 disminuye en un 43% la eficiencia catalítica de translocación del transportador mientras que ET-3 la aumenta en un 30% dicha efectividad, en HA,

reforzando lo anteriormente expresado, mientras que se observó que las ET-1 y ET-3 disminuyen la eficiencia catalítica de translocación del transportador en el HP (43 y 30%, respectivamente). Hasta el momento, nuestros hallazgos son coincidentes con lo documentado por Jayanthi y Ramamoorthy (2005) que sostienen que alteraciones típicas en la cinética durante la modulación aguda de un neurotransmisor son la variación de la V_{max} con muy poca o casi nula variación de la afinidad del sustrato (K_m). De ésta manera, éste mecanismo de reciclaje representaría no solo un mecanismo de regulación de la disponibilidad de la NA en el espacio sináptico sino que también sería un mecanismo importante para la economía del NET en los sistemas biológicos (Bönisch y Brüss, 2006; Mandela y Ordway, 2006; Sung y Blackely, 2007; Mandela y col, 2010; Ramamoorthy y col., 2011, Haenisch y Bönisch, 2011).

A su vez, se sabe que los cambios de V_{max} pueden deberse a variación en la densidad de los transportadores en la superficie de la membrana (Bönisch y Brüss, 2006; Sung y Blackely, 2007; Ramamoorthy y col., 2011). Para confirmar esta hipótesis, fue que decidimos estudiar si las ETs alteran la distribución del NET entre la membrana plasmática y los depósitos intracelulares, mediante la evaluación de la unión de [3H]-NSX. Mediante este estudio se obtuvieron diferentes parámetros, por un lado, el B_{max} que es un parámetro que permite conocer el número funcional del transportador de NA expresados en la membrana y por otro lado el K_d que es la constante de disociación del transportador. Los estudios permiten mostrar que en HA ET-1 disminuyó la B_{max} mientras que ET-3 lo incrementó y no se observan cambios en las constantes K_d , mientras que en el HP ambas ETs redujeron la B_{max} sin modificar la K_d . Esto puede relacionarse a lo observado por diversos trabajos que mostraron que los transportadores Na^+ / Cl^- dependiente, como el NET, presentan un reciclaje entre la membrana plasmática y el compartimento endosomal. Éste reciclaje se realiza a través de una translocación de un lado a otro de la membrana, sin que ello signifique un incremento o disminución en el número total de transportadores (Blackely y Bauman, 2000; Zahniser y Doolen, 2001; Bönisch y Brüss, 2006; Mandela y Ordway, 2006; Sung y Blackely, 2007; Kasparov y Teschemacher, 2008; Ramamoorthy y col., 2011). Este fenómeno es interesante debido a que sería el responsable de la regulación de NET y sirve para mantener los niveles de NA en valores óptimos en el espacio sináptico dependiendo de las necesidades inmediatas. Dicho reciclaje es importante tanto en patologías cardiovasculares como en desordenes del

comportamiento entre otras (Oparil y col., 1995; Watson y col., 2002; Guyenet y col., 2006; Duale y col., 2007; Kasparov y Teschemacher, 2008, Trillo y col, 2013).

A la luz de los resultados obtenidos hasta el momento en este trabajo de tesis, se puede sugerir que la ET-1 en el HA y ambas ETs en el HP disminuyen la captación neuronal de NA probablemente a través de la reducción en la actividad del NET como resultado de una disminución en el número de sitios de unión. Este efecto observado podría deberse a que el transportador sufriría su internalización hacia los compartimentos intracelulares de las terminales noradrenérgicas. Por el contrario, en el HA la ET-3 aumenta la captación neuronal de la NA como resultado de un incremento de la actividad del transportador. Esto será consecuencia de una mayor disponibilidad del NET en la superficie de la terminal axónica producto de un desplazamiento de los transportadores intracelulares a la membrana.

Ya definimos sobre cuál de los transportadores tienen efecto las ETs, las concentraciones a las cuales tienen efecto, el intervalo de tiempo con el que podemos trabajar y determinamos la cinética del transportador y sus mecanismos de down y/o up-regulación producto de la internalización. A continuación analizaremos los receptores y las probables vías involucradas en dichos efectos.

Como se describió previamente en la introducción, el HA es importante para el control de la presión arterial, entre otras funciones (Abrahamson y Moore, 2001). Prueba de esto es que, cuando se estimula el HA, hay una la disminución de la presión en distintas especies de animales normotensos como gatos (Ciriello y Calaresu, 1980; Folkow y col., 1959; Hilton y Spyer, 1971, Benjamín y col., 2004), conejos (Grizzle y col., 1975, Calasso y Parmeggianni, 2008; Burke y col, 2013) y ratas (Gardner y col., 1987, Fortaleza y col, 2012, Du y col 2015). Mientras que si se infunde, mediante la técnica de microdiálisis reversa, metoprolol (Bloqueante selectivo β_1 -adrenérgico) y la Angiotensina (1-7) en el HA de ratas hipertensas con coartación de la aorta abdominal, se observan efectos cardiovasculares tales como la disminución rápida del ritmo cardíaco y la reducción dependiente de la dosis de la presión arterial media (Höcht y col., 2002, 2005).

Se sabe además, que ésta región hipotalámica posee una acción inhibitoria del sistema simpático y provoca una activación del output vagal del corazón (Oparil y col., 1995; Flak y col. 2014, Ondicova y col., 2014). También, se comprobó que, cuando se inyecta NA directamente al

HA de gatos (*Struyker Boudier y col., 1974, Stoddard y Bergdall, 1992*) y de ratas (*Poole, 1983, Ondicova y col., 2014*), se produce una disminución de la presión arterial y frecuencia cardíaca, con respuestas dosis dependientes. En este sentido, se observó que un aumento de la presión arterial, produce un incremento de la liberación de la amina en éste área (*Robinson, 2003*). Por el contrario, en conejos se observó que la reducción de la presión arterial conduce a una disminución en la liberación de NA en el HA (*Katholi y col., 1980; O'Hagan y col., 1990; Oparil y col., 1995; Doggrell y col., 1998; Kara y col., 2003*)

Diversos autores resaltan la relevancia del HP debido a que ésta región diencefálica regula la función cardiovascular. Prueba de esto es que su estimulación produce un incremento de la actividad simpática que lleva al aumento de la presión arterial en animales normotensos (*Smith y Barron, 1989, Oparil y col., 1995; Kasparov y Teschemacher, 2008*). Por el contrario, si se producen lesiones en dicha área hipotalámica se reduce la presión arterial en diferentes modelos de ratas hipertensas tales como las DOCA-sal y SHR (*Bunag y Eferakeya, 1976, Oparil y col., 1995*). También se observó que en ésta región hipotalámica existe un efecto presor luego de la estimulación eléctrica de neuronas de ésta área, y que además es mayor en ratas hipertensas que en normotensas (*Oparil y col., 1995, Kuwaki y col., 1997*).

Esta región hipotalámica se encuentra estrechamente relacionada con la actividad noradrenérgica debido a que se observó un incremento de esta en el HP del modelo genético de hipertensión, SHR, (*Oparil y col., 1995; Kasparov y Teschemacher, 2008*). Aunque existen datos controversiales sobre la actividad noradrenérgica en el HP de ratas hipertensas DOCA-sal, recientemente nuestro grupo demostró que hay un incremento de la transmisión noradrenérgica en esta región en este modelo animal de hipertensión sal dependiente (*Abramoff y col., 2015*). Otro indicio de la relación de las CAs el HP y la presión arterial es que la inyección de las aminas en ésta área hipotalámica produce un aumento de la presión arterial (*Nakata y col., 1990*).

Por su parte, esta descrito la existencia, tanto en el HA como en el HP, de los receptores de ETs así como también la síntesis de estos péptidos, encontrándose sus formas maduras en diferentes núcleos y áreas de estas regiones hipotalámicas (*Krsmanović y col. 1991; Cao y col. 1993; Nakamura y col. 1993; Yasin y col. 1994; Mosqueda- García y col. 1995; Kurokawa y col., 1997, Mukherjee y Loesch, 2002, Naidoo y col, 2004, Braash y col., 2009, Braash y Scharlt, 2014*).

Diferentes autores definieron una interacción entre las ETs y el sistema catecolaminérgico central, observando diversos efectos cardiovasculares por la aplicación a nivel central de estos péptidos, lo cual provoca cambios en la descarga simpática. Dichos cambios se anulan con el bloqueo ganglionar pero no con agonistas de angiotensina II o vasopresina (Kuwaki et al, 1990). Por su parte, la respuesta presora inducida por la inyección ICV de ETs en ratas y conejos también se inhibe por inyección de antagonistas α 1-adrenergicos (Kuwaki et al, 1990; Yamamoto, et al, 1992; Ono et al, 1995).

El paso siguiente de nuestra investigación fue la definición de los receptores involucrados en los efectos de las ETs sobre la captación neuronal de NA. Se observó en ambas regiones hipotalámicas que la disminución de la captación-1 producido por la ET-1 es mediado por el receptor ET_B. En el HA la acción inhibitoria de ET_B coincide con trabajos previos de nuestro laboratorio en los que documentamos que en el HA, ET-1 disminuye, a corto plazo, la liberación de NA y la actividad de TH a través del citado receptor ET_B (*di Nunzio y col, 2002; Morgazo y col., 2005*), sin embargo en el HP se observó no coinciden con los resultados de nuestro laboratorio debido a que los efectos mediados por ET-1 sobre dichos pasos de la transmisión noradrenérgica lo mediaban receptores atípicos de ETs (*di Nunzio y col., 2004; Perfume y col., 2007; 2008*). En este sentido, Fink y colaboradores (2007) mostraron que la activación crónica (5 días) del receptor ET_B, usando el agonista selectivo (sarafotoxin 6c) permite el desarrollo de un modelo de hipertensión arterial. En este modelo, se observa el aumento de presión arterial y un ligero incremento de los niveles plasmáticos de ETs. La hipertensión no es revertida por antagonistas ET_A (atrasentan) y si por antagonistas ET_B (A186280) (Fink y col., 2007). Éstos autores explican que la hipertensión generada podría deberse a la activación del sistema simpático (Pollock y col., 2000, Fink y col., 2007). Por otra parte, al bloquear el receptor ET_B en animales normotensos hay incremento de ET-1 mientras que no hay cambios en animales hipertensos DOCA-Sal. Esto sugiere pensar que no hay depuración de ET-1 en estos animales, lo que contribuiría al incremento en el tono vascular (Wang y col., 2005). Por otra parte, existe un modelo de animales deficientes en el receptor ET_B (spotting-lethal rat) cuyas características son baja renina, una leve proteinuria, y existen problemas en la depuración de creatinina, además de hipertensión. Una hipótesis de estas características relaciona la deficiencia del receptor ET_B a nivel renal con la hipertensión (Matsumura y col., 2000; Ohkita y col., 2005). En estos animales deficientes en el receptor ET_B se

observa un aumento en los niveles de ET1 circulantes como también en riñón y aorta. Además, Ohuchi y col. (1999) observaron un incremento de la presión arterial en ratones ET_B-deficientes, lo que sugiere que este subtipo de receptor podría tener un papel depresor esencial para mantener la presión arterial dentro del rango normal. Asimismo, el receptor ET_B parece tener, también, un papel protector contra el desarrollo de la hipertensión y la hipertrofia cardíaca en diferentes modelos experimentales de hipertensión (Matsumura y col., 1999; Ohuchi y col., 1999; Giardina y col., 2001). Otras pruebas que demuestran la importancia del receptor ET_B en la fisiología cardiovascular son la utilización de herramientas farmacológicas (inhibidores específicos o agonistas ET_B) o ratones Knock out del receptor ET_B. En éstos modelos se observó que se producía no solo un aumento importante de la presión arterial sino que además, la hipertensión generada es dependiente de una dieta rica en sal (Gariep y col., 2000, Pollock y Pollock., 2001; Granger, 2003; Ohkita y col., 2005; Dhaun y col., 2008, Horinouchi y col., 2013).

A los efectos periféricos discutidos en el párrafo anterior, se suman lo aportado por diversos trabajos que muestran diferentes efectos centrales de las ETs son mediados a través del receptor ET_B. En este sentido se observó que el mismo se expresa en neuronas de las regiones del SNC involucradas en el control de la función cardiovascular como el hipotálamo de ratas (Kuwaki y col., 1997; D'Orleans-Juste y col., 2002; Mathison e Israel, 2003). Además, se demostró su acción sobre las terminales neuronales hipotalámicas en donde el receptor ET_B se encuentra cercano a dichas terminales axónicas y que son responsables de la liberación de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) (Yamamoto y Uemura, 1998, Garrido e Israel, 2004). Por otra parte, diversos autores reportaron que la activación del receptor ET_B mediante la aplicación central ET-1 reduce el aumento de la temperatura corporal en ratas provocada por la administración intracerebroventricular de lipopolisacárido (D'Orléans-Juste y col, 2002, Fabricio y col., 2005). Al principio se pensaba que el receptor ET_A era el responsable de los efectos vasoconstrictores y de aumento de la frecuencia cardíaca cuando las ETs se administraban tanto centralmente como periféricamente, mientras que los receptores ET_B eran responsables de las propiedades vasodilatadoras (Kawanabe y Nauli, 2011, Khalil, 2011, Mazuka y Khalil 2012). A partir del reporte que cita la presencia del receptor ET_B sobre el músculo liso de los vasos sanguíneos de baja resistencia, ésta dicotomía funcional de los receptores recién explicada ya es poco aceptada (Moreland y col., 1992). Sobre esta base diversos autores sustentan el nuevo paradigma acerca

del papel que juegan las ETs centrales y que convalidarían nuestros resultados (*van den Buuse y Webber, 2000; García-Segura y col., 2008; Dashwood y Loesh; 2010 Watts S, 2010*)

Siguiendo con la discusión de los receptores involucrados en modular la captación, encontramos que la ET-3 ejercería su efecto estimulador sobre la captación neuronal de NA en el HA e inhibiría este proceso a nivel del HP, en ambos casos a través de la activación de un receptor atípico o no convencional (*Opgenorth 1995; Nambi y col., 1997; Hay y col., 1998; Henry y col., 1999; Pollok y Pollok, 2001; Harada y col, 2002; di Nunzio y col., 2004*). Éstos receptores atípicos, llamados por algunos autores ET_{AX} y ET_{BX}, fueron clonados en hígado y corazón de *Xenopus laevis*, y muestran homología con los receptores ET_A y ET_B (*Opgenorth, 1995*). Además, se describieron sitios de unión ET_A sensibles e insensibles al BQ-123 (antagonista específico ET_A) en el iris y tráquea de conejo, en vena safena humana entre otros (*Gray y col., 1995; Nishiyama y col., 1995; Yoneyama y col., 1995; Satoh y col., 1996*). Por otra parte, se observó que el BQ-123 inhibía la contracción de aorta por ET-3 con mayor eficiencia que la producida por ET-1, lo que sugería la existencia de diferentes poblaciones de receptores (*Summer y col., 1992*). Nambi y col. (1997) identificaron un receptor de ET que se unía a ligandos selectivos ET_A y ET_B. Asimismo, los receptores ET_{AX} o ET_{BX} se encontraron expresados en células COS-7 y si bien sobre ambos receptores tienen acción tanto ET-1 como ET-3, ninguno de ellos respondió a BQ-123 (antagonista selectivo del receptor ET_A) ni a sarafotoxina 6C (agonista del receptor ET_B) (*Opgenorth, 1995*). Sin embargo, en músculo liso, se caracterizaron tres subtipos de receptores atípicos y se demostró que dos de los subtipos de receptores se acoplaban a la liberación de NO (ET_A y ET_{B1}) mientras que el tercer subtipo se relacionaba con la vasoconstricción (ET_{B2}) (*Sokolovsky, 1995*). También se describió y caracterizó al subtipo de receptor ET_{BX} en vejiga de perros, bazo de mono y humano (*Nambi y col. 1997*). Por otro lado, se observó que en la modulación de la secreción de hormonas pituitarias participan dos de los receptores ET_A, ET_{A1} y ET_{A2} en lactotrofos, tirotrofos y gonadotrofos (*Sokolovsky, 1995*). Sin embargo, todavía queda por esclarecer si estos receptores son idénticos a los receptores convencionales, y por lo tanto, tienen propiedades similares como la habilidad de oscilar entre dos estados de afinidad (sitios picomolar y nanomolar) o si representan diferentes subtipos de receptores (*Sokolovsky 1995*).

También como se expuso con anterioridad este comportamiento atípico de los receptores de ETs se puede explicar debido a la posible formación de dímeros (homo o

heterodimerización) comportándose como unidad molecular con un comportamiento diferente o atípico (Harada y col., 2002; Schneider y col., 2006; Klammt y col., 2007; Schneider y col., 2007; Evans y col., 2008; Boësen y col., 2008; Morawiez y col., 2009; Watts S, 2010). De hecho se encontró diferencias en la heterodimerización entre vena cava y aorta de animales DOCA-Sal (Watts y col., 2007). Otra explicación al comportamiento atípico es el cooperativismo de las ETs, es decir, que la misma se une al receptor de ET_A a través de su porción N terminal y al receptor ET_B a través de su porción C terminal comportándose como un ligando bivalente (Harada y col., 2002; Grogan y col., 2004, Boësen, 2008, Horinouchi y col., 2013).

Otra posibilidad que se sugiere sobre la base de los trabajos de Karne y col. (1993) es la posible existencia de un tercer receptor de ETs el cual fue clonado y caracterizado por estos investigadores en *Xenopus laevis* y que denominaron receptor ET_C el que mostró una alta afinidad por ET-3. Esto es concordante con lo demostrado por trabajos previos realizados en nuestro laboratorio, en los cuales, demostramos que las ETs modulan la liberación neuronal de NA y la actividad y expresión de TH tanto en el HP como en el BO a través de un receptor atípico o no convencional, o ET_C (di Nunzio y col., 2004; Perfume y col., 2007, 2008;; Nabhen y col., 2009).

Con el objeto de definir con mayor precisión la participación de los citados receptores involucrados en las respuestas observadas se estudiaron los efectos de un agonista ET_{A/B} y uno ET_B específico (Sarafotoxina-6b e IRL-1620, respectivamente). Los resultados obtenidos en el HA con los agonistas no permitieron terminar de definir claramente si el efecto producido por las ETs son mediados por ET_A o ET_B específicamente. Estas respuestas no convencionales observadas frente a los agonistas y a los antagonistas específicos de los receptores clásicos de ETs, confirman que la ET-3 ejerce sus efectos a través de un receptor atípico o no convencional, mientras que para el caso de la ET-1 es más claro que el efecto es vía la activación del receptor ET_B. Por su parte en el HP ambos agonistas disminuyen la captación neuronal de NA lo que nos permite concluir que ambos receptores tendrían un comportamiento similar haciendo más fuerte la conclusión de la existencia de un comportamiento atípico de los receptores de las ETs, al menos sobre este mecanismo estudiado. Sobre esta base y tal como fuera comentado previamente todavía no podemos definir con certeza como es la mecánica de unión de las ETs a sus receptores y como se comportan estos, necesitándose realmente no solo mas estudios, sino definir claramente como es el comportamiento de los mismos. Por lo tanto y a la luz de los resultados, no es posible definir

con exactitud el receptor o los receptores involucrados debido al comportamiento atípico del mismo al definir el receptor a través del cual ejerce sus acciones la ET-3 sobre el uptake en ambas regiones hipotalámicas. Si bien, estudios de unión y funcionales sugieren su existencia, el receptor a ET_c no se ha clonado aun en mamíferos. Sin embargo, hasta la fecha son más teorías que certezas, y se necesitan más estudios para probar esta suposición, mas teniendo en cuenta las últimas afirmaciones.

Se sabe que los receptores clásicos de ETs pertenecen a la familia de receptores que están acoplados a proteína G (*Chahdi y col., 1998; Holler y col., 1999; Shagra-Levine y col., 2000; Rauh y col., 2008; Alken y col., 2009; Horinouchi y col., 2013*). En estos experimentos pudimos corroborar que los efectos de la ET-1 y ET-3 sobre la captación neuronal de NA tanto en HA como en HP eran mediados por receptores acoplados a proteína G (ETB y receptores atípicos o no convencionales, respectivamente).

Las ETs al unirse a sus receptores que se encuentran acoplados proteínas G (Gs, Gq, Go, Gi), activan múltiples vías intracelulares de señalización por lo que son considerados receptores promiscuos (*Fig.11*) (*Opgenorth y col., 1995; Sokolovsky M, 1995; Kuwaki y col., 1997; Naicker y col., 2001; Motte y col., 2006, Horinouchi y col., 2013*). De allí no solo son los múltiples efectos sobre diferentes parámetros fisiológicos que regulan, sino que también sobre una misma función biológica puede tener diferentes efectos dependiendo de varios aspectos. Así fue demostrado hasta el presente en este trabajo de tesis. Como fuera comentado previamente, la captación neuronal de NA se produce desde el espacio sináptico hacia el interior de la terminal noradrenérgica a través del NET (*Xu y col., 2000; Zahniser y Doolen, 2001, Xu y col, 2007, Blakely y Edwards, 2012*). Este transportador se regula por distintos mecanismos intracelulares, siendo la vía más común la fosforilación. El NET puede expresarse en la superficie de la neurona o ser internalizado a los depósitos intraneuronales listos para migrar a la superficie cuando la situación lo requiera, siendo este un mecanismo de suma importancia para la regulación de la concentración de la NA en el espacio sináptico (*Apparsundaram y col. 2001, Zahniser y Doolen, 2001, Xu y col, 2007, Blakely y Edwards, 2012*). Sobre la base de los resultados obtenidos en donde determinamos que las ETs actúan sobre la captación neuronal de NA modulando el equilibrio entre NET expresada en membrana y NET internalizada, sin modificar la afinidad del transportador. En éste sentido, ya se mencionó que tanto la activación neuronal como diversas

sustancias como por ejemplo diversos antidepresivos que regulan la densidad del NET en la superficie de la membrana, y lo realizan a través de la participación de segundos mensajeros intracelulares como quinasas y fosfatasas (Mandela y Ordway, 2006; Sung y Blackely., 2007, Xu y col, 2007, Blakely y Edwards, 2012). Esto produce la fosforilación del NET, asociados a dichas quinasas, fosfatasas y a proteínas de andamiaje (Blakely y Bauman, 2000; Apparsundaram., 2001, Blakely, 2005). Las principales proteínas quinasas que intervienen en éstos procesos son PKA, PKC, PKG y CaMK II las que producen la fosforilación del transportador, regulando la expresión del NET y en consecuencia la captación neuronal de la NA y su concentración en el espacio sináptico (Sung y Blackely, 2007, Mandela y Ordway, 2006, Ramamoorthy y col., 2011).

Por ésta razón, el paso siguiente fue verificar cual o cuales de esas vías es la responsable de los efectos de las ETs sobre la captación neuronal de la NA y la regulación del NET.

En principio, se tuvo en cuenta que la activación del receptor ET_B está acoplado a la formación de NO (Yamada y col., 1999; Plato y col., 2000; Mathinson y col., 2002, Pollok y Pollok, 2008, Horinouchi y col., 2013). Además, diferentes trabajos sustentan el papel relevante del NO en la regulación de diversos mecanismos fisiológicos controlados por distintos núcleos y regiones del SNC incluido el hipotálamo (Persson y col., 1996; Krukoff 1999; Rossi y col., 2004; Stern y Zhang 2005, Filosa y col, 2012, Du y col. 2015). Los resultados del estudio de la vía del NO/GMPc/PKG nos permitió determinar que los efectos de la ET-1 en el HA involucran solo la formación del NO sin que participen el GMPc y la PKG. En este sentido, cuando estudiamos el proceso de internalización del NET pudimos determinar que el inhibidor de la isoforma neuronal de la NOS revertía los efectos producidos por la ET-1, sin embargo la inhibición de la PKG no la afectaba. Estos datos confirman lo observado previamente cuando se evaluó la participación de la vía del NO/GMPc/PKG en los efectos que la ET-1 tiene sobre la captación de NA. Por su parte en el HP los resultados mostraron que la ET-1 (vía ET_B) y la ET-3 (vía receptor atípico o no convencional) disminuyeron la captación neuronal de NA a través de la regulación de la isoforma neuronal de la NOS, sin involucrar la cascada del GCs/cGMP/PKG. El estudio del proceso de internalización mostró que el 7-NI (inhibidor de la isoforma neuronal de NOS) bloqueó el efecto producido por ambas ETs en el HP. Diversos trabajos confirman que la ET-1 ejerce muchas de sus acciones a través de la activación del NO, que en algunos casos pueden estar relacionados o no con los efectos que nosotros observamos en este trabajo de Tesis. Así se observó que la inyección

"*in bolus*" de ET-1 que produjo una respuesta bifásica sobre la presión arterial, induciendo primero, una disminución transitoria de la presión debido a la liberación de NO y luego, un incremento sostenido como resultado de la acción directa de las ETs como también indirecta por estimulación de la actividad simpática (Kuwaki y col., 1999; 1997; Gulati y col., 1997, Davenport y col., 2006, Horinouchi y col., 2013). También se demostró que la activación del receptor ET_B incrementa la síntesis de NO en ganglio estrellado de perro y en la eminencia media de rata (Yamada y col., 1999; Mathinson y col., 2002). Además, la NOS se localiza en distintas regiones y áreas del SNC incluyendo el hipotálamo (Rodrigo y col. 1994; Iwase y col., 1998; Krukoff 1999 Rossi y col., 2004; Stern y Zhang 2005, Filosa y col, 2012, Du y col. 2015). Ésta enzima se co-expresa con varios neurotransmisores (NA, DA, entre otros), neuromoduladores (angiotensina, ETs), hormonas (oxitocina, vasopresina) y diversas enzimas (TH, acetilcolinesterasa) (Rodrigo y col. 1994; Krukoff 1999) que coinciden con nuestros hallazgos. Estudios de nuestro laboratorio muestran que ambas ETs aumentan la actividad de la isoforma neuronal de la NOS vía receptor ET_B en HA de ratas macho Sprague-Dawley (Jaureguiberry y col., 2004). Por otra parte, también demostramos que en el HA la ET-1, a través de su unión al receptor ET_B activa la vía del NO y disminuye a la liberación de NA y la actividad y expresión de TH (di Nunzio y col., 2002; Morgazo y col., 2005). Es conocido que el NO y sus congéneres son moléculas importantes a nivel del sistema cardiovascular y como neurotransmisores putativos en el SNC (Kaye y col., 1997, Stern y Zhang 2005, Filosa y col, 2012, Du y col. 2015). En concordancia con nuestros hallazgos se determinó que en células PC12 tratadas con donores de NO la captación de NA se inhibía y que este efecto era GMPc independiente. Así se observó que estas células incubadas con análogos del GMPc y con inhibidores de la guanilato ciclasa soluble no tenían modificaciones en la captación neuronal de NA (Kaye y col., 1997, 2000). Es importante destacar que diferentes autores demostraron que el NO inhibe a la bomba Na⁺/K⁺ ATPasa la que es crucial en el proceso de captación (Muriel y col., 2003; Tipsmark y Madsen, 2003). En éste sentido, trabajos de nuestro laboratorio demostraron que inhibidores endógenos (endobaina) de la bomba Na⁺/K⁺- ATPasa reduce la captación de NA en el hipotálamo de rata (Vatta y col, 2004). Además de este efecto indirecto, el transportador se ve influenciado directamente a través de la trans-nitración de los residuos cisteína del NET (Kaye y col., 1997; 2000). Diversos autores postulan que la generación de peroxinitritos, por la interacción de NO y el anión superóxido, conduce a la nitración y peroxinitración de algunos transportadores

reduciendo así su actividad, por lo tanto estos mecanismos no pueden excluirse ya que podrían participar en la disminución de la recaptación en respuesta a ETs (Ara y col., 1998; Blanchard-Fillon y col., 2001). Por su parte, Bryan-Lluka y col. (2001) demostraron que la incubación de células PC12 o SK-N-SHSY5Y con análogos del GMPc no modificaban la actividad del NET. Por otra parte recientemente Förstermann y Sessa (2012) describen la función servoreguladora del NO sobre algunos neurotransmisores. Estos autores afirman que la nNOS modula funciones fisiológicas tales como el aprendizaje, la memoria y neurogénesis. También sostienen que en el SNC, la nNOS media la regulación a largo plazo de la transmisión sináptica (potenciación a largo plazo, la inhibición a largo plazo). Se presume que hay una comunicación retrógrada a través de uniones sinápticas de participar en la formación de la memoria, y hay evidencia de que los inhibidores de NOS deterioran el aprendizaje y producen amnesia en modelos animales. También hay pruebas de que NO formado en el SNC por nNOS está involucrado en la regulación central de la presión sanguínea, prueba de ello es que el bloqueo de la actividad de nNOS en la médula y el hipotálamo provoca hipertensión sistémica. En este sentido, Simaan y Sabra (2011) hablan de la potenciación entre el NO y la captación de NA para regular la presión. Éstos autores concluyen la síntesis de NO no solo disminuye el efecto de bloqueantes de la captación neuronal de NA, como la cocaína, sino que además estaría implicada la síntesis de novo de NO, para modular captación-1 y regular la presión. Sin embargo, Apparsundaram y col (1998a), observaron que el tratamiento con un donador de NO de células SK-N-SH producían un incremento de la captación de NA. Estas discrepancias no hacen más que reafirmar lo dicho anteriormente que la regulación de la concentración de NA es región específica y en este caso también tipo celular específica.

Como se demuestra en los resultados, en el HA, los efectos de la ET-1 sobre la captación 1 de NA son mediados a través de la PKC y en el caso de la ET-3 el incremento de la captación neuronal de la amina se inhibe por la acción del antagonista de los receptores de IP_3 del retículo endoplasmático (2APB). Una confirmación de que la PKC está relacionada con la reducción de la captación de NA es que la incubación con el activador de PKC (β PMA) produce una disminución del 58%. Cabe aclarar que el éster de forbol β PMA es activador de la PKC no-selectivo y se ha demostrado que activa tanto las isoformas de PKC convencionales y no convencionales, pero no las isoformas de PKC atípicas (Bray y Mynlieff, 2011). En este sentido, en el HA observamos también que sobre el proceso de internalización del NET el inhibidor de la PKC afecta solo la

reducción inducida por ET-1 sin modificar el incremento producido por ET-3. Los resultados obtenidos en esta parte nos permiten determinar que esta vía estudiada no está relacionada con el incremento en la captación neuronal de NA producido por la ET-3 en el HA. Por su parte, en el HP se observa que la PKC está involucrada en la acción de ambas ETs. Además, corroborando estos resultados determinamos que β PMA disminuye la captación neuronal de NA al igual que ambas ETs. Respecto de la internalización del NET a nivel del HP, la inhibición de la PKC modifica los efectos producidos por la ET-1 y la ET-3.

La PKC participa en la regulación de la función y de la expresión en la membrana de diferentes transportadores de monoaminas en general. En el caso específico del NET, este tiene diferentes sitios potenciales de fosforilación por PKC. En este sentido células COS-7 transfectadas con NET humana e incubadas, a corto plazo, con agonistas de PKC (PMA), con ácido okadaico (inhibidor de fosfatasas) y staurosporina (antagonista de la PKC) no afectaron la captación de NA. Sin embargo la exposición con PMA a largo plazo disminuye la captación de la amina, siendo este efecto debido a la reducción en la velocidad del transporte (V_{max}) sin afectar la constante de afinidad (K_m) (Bönisch y col., 1998). En este sentido, se demostró que la fosforilación del NET es seguido de su internalización hacia los depósitos intraneuronales, siendo la reducción de su expresión en la membrana plasmática el mecanismo primario mediado por PKC (Apparsundaram y col., 1998b). Estos resultados demuestran claramente que la PKC puede regular la actividad del NET mediante la modulación del su equilibrio entre los transportadores expresados en la membrana y los pools que se encuentran la fracción citosólica (Mandela y Ordway, 2006). Un mecanismo que no era objetivo de este trabajo de tesis es el de la endocitosis del NET mediado por una vía dinamina y clatrina dependiente. Al respecto Jayanthi y col. (2004) demostraron que este proceso endocitótico es PKC independiente. Por lo tanto, tomando nuestros resultados y los obtenidos por los grupos citados podemos sugerir que la PKC sería uno de los mecanismos a través de los que la ET-1 en el HA y ambas ETs en el HP disminuyen la captación neuronal de NA. En el caso de la ET-3 cuyo efecto estimulador sobre la captación de NA en el HA es mediado por el receptor de IP3, el mismo será discutido cuando se analicen la participación del Ca^{2+} .

Por el contrario, en el HA la ET-3 no involucra la actividad de la NOS en la regulación de la actividad del NET, por lo que se investigaron otras probables vías intracelulares que podrían estar involucradas. Sin embargo, resultados previos de nuestro laboratorio mostraron que en el HA las

ETs incrementaban la actividad de la isoforma neuronal de la NOS y que este mecanismo era mediado por PKC, PKA y CaMKII, es que estos estudios también se realizaron en presencia de ET-1 (*di Nunzio y col., 2002 Jaureguiberry y col., 2004, Morgazo y col., 2005*). Si tenemos en cuenta esto último y habiendo determinado que la ET-1 en el HA y ambas ETs en el HP involucran la actividad de la NOS en sus efectos sobre la captación neuronal de NA, es fundamental determinar estas vías enumeradas previamente. Con este fin, en primera instancia, estudiamos la vía de los fosfoinosítidos, la cual también se inicia a través de la activación de receptores acoplados a proteína Gq los que activan la PLC que cliva posteriormente a los fosfolípidos de membrana liberando IP3 y DAG. Por su parte el IP3 liberado se une a receptores de IP3 que se encuentran en el retículo endoplasmático los que permiten, mediante su apertura, la salida del Ca^{2+} de estos depósitos intracelulares y su aumento a nivel del citoplasma. Por otra parte el DAG activa PKC para producir fosforilación de proteínas target (*Smrcka y col., 2012*).

Por otra parte, la regulación de la captación neuronal de NA producida por las ETs tanto en el HA como en el HP puede, también, estar mediada por otra vía intracelular como la del AMPc/PKA. Se conoce que las ETs a través de sus receptores aumentan la actividad de la adenilato ciclasa que incrementa los niveles de AMPc y activa la PKA. En este caso, los resultados obtenidos muestran que ésta vía no media el incremento de la captación de NA inducido por la ET-3, sin embargo inhibe el efecto de reducción de la captación 1 producido por la ET-1 en el HA y por ambas ETs en el HP. Estos resultados fueron corroborados mediante la utilización del 8-Br-AMPc (análogo de AMPc) y FSK (estimula la producción de AMPc). En ambos casos se observó que ambos disminuyen la captación neuronal de NA en las dos regiones hipotalámicas estudiadas. Respecto de la internalización del NET se observa un comportamiento similar, la inhibición de la PKA no afecta el incremento en la actividad del NET inducida por ET-3 en HA, mientras bloquea la inhibición sobre este proceso que produjo la ET-1 en el HA e HP, y la ET-3 en el HP. Nuestros resultados son coincidentes con lo observado previamente por Bunn y col. (1992), quienes demostraron que el 8-Br AMPc induce una disminución, concentración dependiente, de la captación de NA en células cromafines de médula adrenal bovina. Además, la utilización de FSK (10-100 μM) en este mismo preparado producía una disminución de la captación de la amina (*Bunn y col., 1992*). En un estudio más reciente, se inyectaron ratas con un inhibidor específico de la fosfodiesterasa-4 (enzima que degrada el AMPc), el rolipram, determinándose luego de 3hs que

los niveles de NA en el cerebro, corazón y pulmones se encontraban significativamente aumentados (Lourenco y col., 2006). Nuestros resultados también coinciden con lo observado por Sokolovsky y col (1994, 1995) donde muestran, en slices de cerebelo de rata, que la formación de AMPc mediante concentraciones bajas de ET-1 modifican la liberación en espacio sináptico de CAs y que la ET-3 a concentraciones nM, no afectan la formación de AMPc, actuando de ésta manera, como antagonista de la ET-1, fenómeno este que explica como receptor y tejido específico. En este sentido diversos trabajos muestran que las ETs aumentan la actividad de PKA a través de la estimulación de la adenilato ciclasa y de los niveles de AMPc en diferentes tejidos y células tales como la glándula pituitaria, epidídimo, glomérulo y en cortes cerebrales de rata (Opgenorth y col., 1995; Sokolovsky, 1995; Kurokawa y col., 1997; Nambi y col., 1997; Pérez-Álvarez y col., 2000, Agarwal y col, 2005, Horinouchi y col., 2013). Un hallazgo similar se observó en células endoteliales de aorta bovina, en las que ET-1 es capaz de afectar la producción de estrógenos modulando la habilidad de la FSH en la activación de las aromatasas productoras de estrógeno, proceso mediado a través de la producción local de AMPc y activación de la PKA (Castaldo y col., 2009). Como se puede observar, todos estos resultados sustentan que la vía del AMPc/PKA estaría involucrada, directa y/o indirectamente, en la disminución de la captación neuronal de NA inducida por la ET-1 en HA e HP y por la ET-3 en el HP.

Por su parte, el Ca^{2+} es el mensajero intracelular universal que controla una variedad de actividades celulares como secreción y el metabolismo de diferentes sustancias o expresión de genes, entre tantas otras. Diferentes trabajos demuestran que el Ca^{2+} juega un papel importante en la regulación del NET y por ende modula la captación neuronal de la NA. Al respecto, se sabe que las ETs pueden aumentar la concentración citoplasmática de Ca^{2+} , o por incremento del flujo de Ca^{2+} extracelular y/o también por la liberación del mismo desde los depósitos intracelulares. En el primer caso se produce la activación de canales de Ca^{2+} voltaje dependiente o activados por ligando (Weiss y col., 2001; Andric y col., 2005; Kawanabe y col., 2003; 2005, Tykocki y Watts, 2010), o también la entrada de Ca^{2+} extracelular puede gatillar la liberación del Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares (Friedl, 2004; Patterson y col., 2007). En el segundo caso, diversos trabajos muestran que las ETs inducen la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares por activación de los receptores de IP_3 o los receptores sensibles a rianodina (Kotikloff y col., 2001; Albrecht y col., 2004; Verkhasky y col., 2004, Tykocki y Watts, 2010, Ramamoorthy y col., 2011).

Del análisis de los resultados obtenidos podemos afirmar que la disminución de la captación neuronal de NA inducida por la ET-1 en el HA e HP y por la ET-3 en el HP no está mediada ni por el Ca^{2+} extracelular ni por el proveniente de los depósitos intracelulares y tampoco es dependiente de la CamKII. Por el contrario, el incremento de la captación de NA producido por la ET-3 en el HA involucra la participación del Ca^{2+} extracelular, así como también del Ca^{2+} intracelular proveniente de los canales rianodina sensitivos e involucra a la CamKII. En lo referente al proceso de internalización del NET se observaron resultados similares a los de la captación neuronal de NA. Como fuera comentado previamente el Ca^{2+} juega un papel importante en la regulación de la función del NET. En este sentido y en concordancia con nuestros resultados se demostró que células PC12 preincubadas con concentraciones extracelulares elevadas de Ca^{2+} incrementa la captación neuronal de NA que se caracteriza por un aumento en la V_{max} y la disminución de la K_m del transportador (Uchida y col., 1998). De esta manera la regulación de la función del NET debido a cambios en la concentración de Ca^{2+} puede ser resultado de modificaciones en la actividad de diferentes kinasas dependientes de Ca^{2+} tales como la PKC y la CamKII entre otras. Sin embargo, tanto resultados obtenidos en esta Tesis con los efectos de la ET-3 en HA y de trabajos de otros autores, el aumento en la actividad del NET no se afecta por la inhibición de la PKC (Uchida y col., 1998, Mandela y Ordway, 2006, Annamalai y col, 2010, Ramamoorthy y col., 2011). Por el contrario, la inhibición de la CamKII, tanto en células PC12 como en SK-N-SH, produce la reducción en el incremento de la captación neuronal de NA Ca^{2+} dependiente (Apparsundaram y col., 1998a; Uchida y col., 1998). Además, también se observó que la estimulación de células PC12 con KCl induce no solo un incremento de la liberación de NA sino también activa el mecanismo de captación mediado por el NET el cual es dependiente del Ca^{2+} (Mandela y Ordway, 2006). Recientemente en cultivos de células cromafines bovinas se demostró que el incremento en la captación neuronal de NA inducida por un inductor de la Rho quinasa, el fasudil, es Ca^{2+} -dependiente (Sato y col., 2012). En el mismo modelo experimental en donde la actividad del NET se estimuló con nicotina se determinó que este incremento dependía del Ca^{2+} extracelular y de la CamKII (Itoh y col., 2010). Por otra parte, se demostró que en células SH-SY5Y incubadas con diferentes antagonistas del receptor de IP_3 se producía una disminución de la captación de NA debido a una reducción en la V_{max} del transportador (Amano y col., 2006). Por lo tanto con las evidencias surgidas de trabajos previos y a la luz de los

resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis, el Ca^{2+} es uno de los mecanismos más importantes para la regulación del NET y sería uno de los mediadores involucrados en la regulación de la captación neuronal de NA mediada por las ETs.

En resumen, la ET1 en el HA y ambas ETs en el HP disminuyen la captación neuronal de NA a expensas de la disminución de la actividad del NET debido a una disminución en los sitios de unión. Las modificaciones producidas en la actividad del NET son específicamente sobre la capacidad máxima de transporte de NA sin alterar la afinidad. El efecto inhibitorio de la ET-1 tanto en HA como en el HP es mediado por el receptor ET_B y el de la ET-3 en el HP es a través de un receptor atípico o no convencional. En estos casos, la disminución de la captación neuronal de NA involucra diferentes vías que incluyen a la NOS neuronal y a la PKC y PKA. De esta manera, es probable que éstas vías activen los sitios de fosforilación del transportador produciendo la regulación del mismo en la superficie, aumento su internalización y en consecuencia disminuye el número de transportadores activos.

Por su parte, en el HA el neuropéptido ET-3 incrementa la captación neuronal de NA por aumento de la actividad del NET debido a un incremento del número de transportadores desde el compartimiento intracelular hacia la membrana. Este efecto sería a través de la activación de un receptor atípico o no convencional e involucra mecanismos calcio dependientes.

Los neuropéptidos regulan diversos pasos del proceso de neurotransmisión entre ellos la inactivación de los neurotransmisores en el espacio sináptico. En el caso particular de la NA, la captación neuronal es un complejo proceso y que se encuentra altamente regulado por diversos mecanismos y sustancias entre los que se encuentran los neuropéptidos. En este sentido y referido específicamente a las ETs, Backs y col. (2005) fueron los primeros en describir la interacción entre estos péptidos y la captación de NA. Estos autores observaron que la ET-1 a través de la activación del receptor ET_A inhibían, de manera concentración dependiente, la captación de NA en corazones perfundidos. Además, demostraron que el darusentan (antagonista ET_A) reducía la captación de NA y el número de sitios de unión del NET en un modelo de ratas con falla cardíaca congestiva (Backs y col., 2005). Seguido a esto, en 2008 nuestro grupo reportó por primera vez una interacción entre las ETs y la captación neuronal de NA a nivel central en animales normotensos, lo que corresponde a parte de este trabajo de Tesis.

Ahora bien, ¿cómo podemos complementar resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio y los datos obtenidos en el presente trabajo?

Previamente evidenciamos que las ETs regulan dos pasos importantes involucrados en la transmisión noradrenérgica tanto en el HA como en el HP, la liberación neuronal de NA (di Nunzio y col. 2002; 2004) y la actividad y expresión de la TH (Morgazo y col. 2005; Perfume y col., 2007; 2008). Si tomamos en conjunto estos resultados con los obtenidos en la presente Tesis podemos concluir que:

- En el HA , una región simpatoinhibitoria cuya activación induce una disminución de la presión arterial, proponemos que la inhibición en la transmisión noradrenérgica inducido por las ETs, podrían ser responsables del aumento central de la actividad simpática que sería la responsable del incremento de la presión arterial producida cuando estos péptidos son administrados centralmente. De esta manera, ambas ETs disminuyen la liberación neuronal de NA y la actividad y expresión de TH e inducen una down-regulación o up-regulación del NET (ET-1 y ET-3, respectivamente). Todos estos mecanismos, en su conjunto, llevan a una disminución de NA en el espacio sináptico lo que induce una reducción en la simpatoinhibición en el HA resultando esto en una disminución del output simpático.
- En el HP, una región simpatoxitatoria cuya activación induce un incremento de la presión arterial, proponemos que el incremento en la transmisión noradrenérgica inducido por las ETs, podrían ser responsables del aumento central de la actividad simpática que sería la responsable del incremento de la presión arterial producida cuando estos péptidos son administrados centralmente. Así, tanto la ET-1 como la ET-3, incrementan la liberación neuronal de NA y la actividad y expresión de TH, además de producir una down-regulación del NET. Todos estos mecanismos llevan a un aumento de NA en el espacio sináptico lo que induce el incremento de la actividad noradrenérgica y del output simpático.

Pocos pero contundentes son los trabajos que demuestran que el aumento de la presión arterial inducida por ETs administradas centralmente sería debido al incremento de la actividad simpática (Yamamoto y col., 1992; Poulat y col., 1994; Ono Kaneko, 1995; Gulat y col., 1997;

Kuwaki y col., 1997; Kedzierski y col., 2001; Penna y col., 2006). Por otro lado, ciertas alteraciones fisiológicas periféricas pueden modificar los niveles de ETs en el LCR. En este sentido, la activación de los barorreceptores arteriales de rata por incremento de la presión arterial, produce un aumento de la concentración de ETs en el LCR de un 36 % respecto del grupo control. Esta alteración en los niveles de ETs producida por activación de los barorreceptores fue bloqueada por denervación sino-aórtica (*Mosqueda-García y col., 1993*). Varios autores observaron que la aplicación directa de ETs en diferentes regiones del cerebro (intracisternal, médula ventrolateral, núcleo del tracto solitario) regula distintas funciones biológicas, incluyendo la presión arterial, la actividad del nervio simpático renal, la frecuencia cardíaca y la frecuencia respiratoria (*Gulat y col., 1997; Kuwaki y col., 1997; Kedzierski y col., 2000; Rossi y col., 2001*). Por otra parte, ET-1 incrementa la actividad neuronal del núcleo del tracto solitario (*Shihara y col., 1998*), mientras que Yamamoto y col., (*1993*) observaron que la ET-1 y la ET-3 estimularon directamente las neuronas del AV3V e inhiben las del SON en cortes de cerebro de rata. Estos autores postulan la hipótesis de que las ETs podrían excitar directamente las neuronas del AV3V produciendo la modulación del sistema autónomo simpático. Por otra parte, recientemente demostramos que la administración “*ex vivo*” de ET-1 y ET-3 en diferentes regiones de SNC de animales hipertensos DOCA-sal producen alteraciones de la transmisión noradrenérgica que serían responsables del incremento de la actividad simpática central característica de este modelo de hipertensión arterial (*Abramoff y col., 2013; 2015*). Además, recientemente observamos que es sistema endotelinérgico endógeno central está implicado en la regulación de la transmisión noradrenérgica central, lo que resultaría en las modificaciones de la regulación de la presión arterial (*Guil y col., Trabajos en preparación; Cassinotti y col., Trabajos en preparación*).

Por lo tanto y para cerrar el análisis de los resultados, y teniendo en cuenta los datos previos y los hallazgos del presente trabajo de Tesis podemos sugerir que la modulación de la transmisión noradrenérgica a nivel hipotalámico podría ser uno de los mecanismos que median los efectos cardiovasculares inducidos por el sistema endotelinérgico central. Sin embargo, se necesitan más estudios para poder aclarar como la interacción ETs – CAs - hipotálamo participa en la génesis y /o mantenimiento de patologías cardiovasculares, tales como la hipertensión. Aclarar los mecanismos involucrados en los efectos centrales de las ETs podría proveer nuevo conocimiento que resulte en posibilitar nuevas herramientas para la terapéutica de la hipertensión

arterial. En este sentido, nuestro laboratorio sigue desarrollando distintas líneas de trabajo con el objeto de aclarar estos paradigmas.

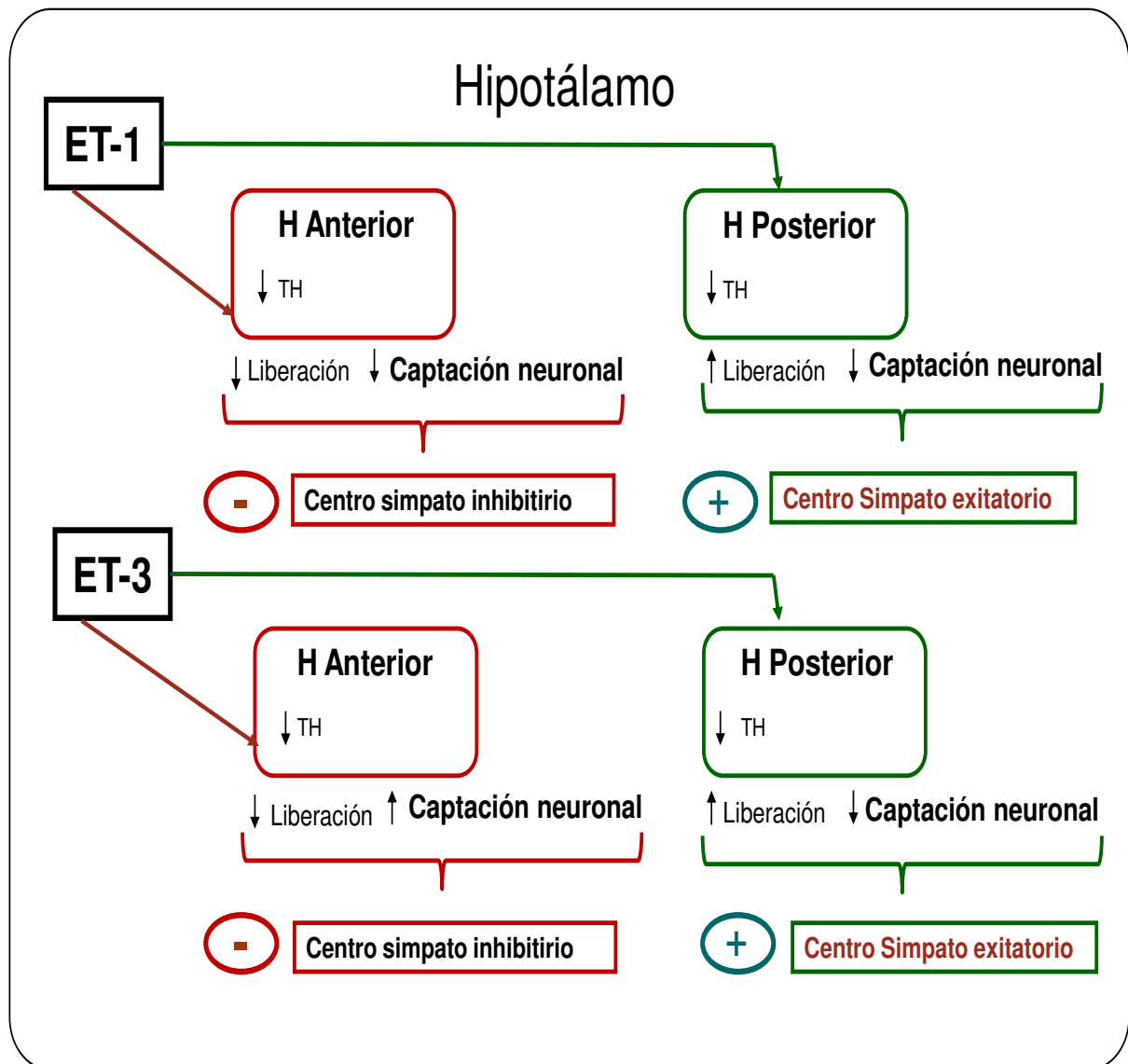


Figura 42. Probable mecanismo de acción de las endotelinas-1 y -3 (ET-1 y ET-3) sobre la transmisión noradrenérgica a nivel del hipotálamo anterior y posterior.

6-Conclusiones

A la luz de los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis se demuestra que tanto la ET-1 como la ET-3 modulan la captación neuronal de noradrenalina en ambas regiones hipotalámicas estudiadas. La complejidad de acción de los receptores endotelinérgicos y los diversos mecanismos intracelulares que pueden ser activados juegan un papel esencial en la regulación noradrenérgica a nivel del espacio sináptico. De esta manera la unión de las ETs a sus receptores inician distintas cascadas de eventos intracelulares que modulan diferencialmente la actividad y la expresión del NET en la superficie de la neurona. En consecuencia, estos fenómenos regulan la neurotransmisión noradrenérgica jugando así un papel importante en todos los procesos biológicos que regula esta interacción a nivel del HA e HP en animales normotensos.

Resumiendo los resultados obtenidos vemos que:

En el Hipotálamo Anterior:

I- La ET-1 (Figura 45):

- ✓ Disminuye la captación neuronal de NA a expensas de la reducción de la actividad del NET debido a una disminución en los sitios de unión (B_{max}), sin modificar la K_d . Este efecto es resultado de un incremento en la internalización del transportador.
- ✓ El efecto inhibitorio de la ET-1 es mediado por el receptor ET_B unido a proteína G.
- ✓ Involucra diferentes vías intracelulares: NOS neuronal, PKA y PKC.

II- La ET-3 (Figura 45):

- ✓ Incrementa la captación neuronal de NA a través del aumento de la actividad del NET. Este efecto es debido a un incremento del número de sitios de unión (B_{max}), sin modificarse la K_d . Este efecto es resultado de una disminución en la internalización del transportador.
- ✓ Ejercería su efecto a través de la activación de un receptor atípico o no convencional el cual está acoplado a una proteína G.
- ✓ La activación del complejo receptor atípico/proteína G involucra diferentes mecanismos intracelulares Ca^{2+} dependientes.

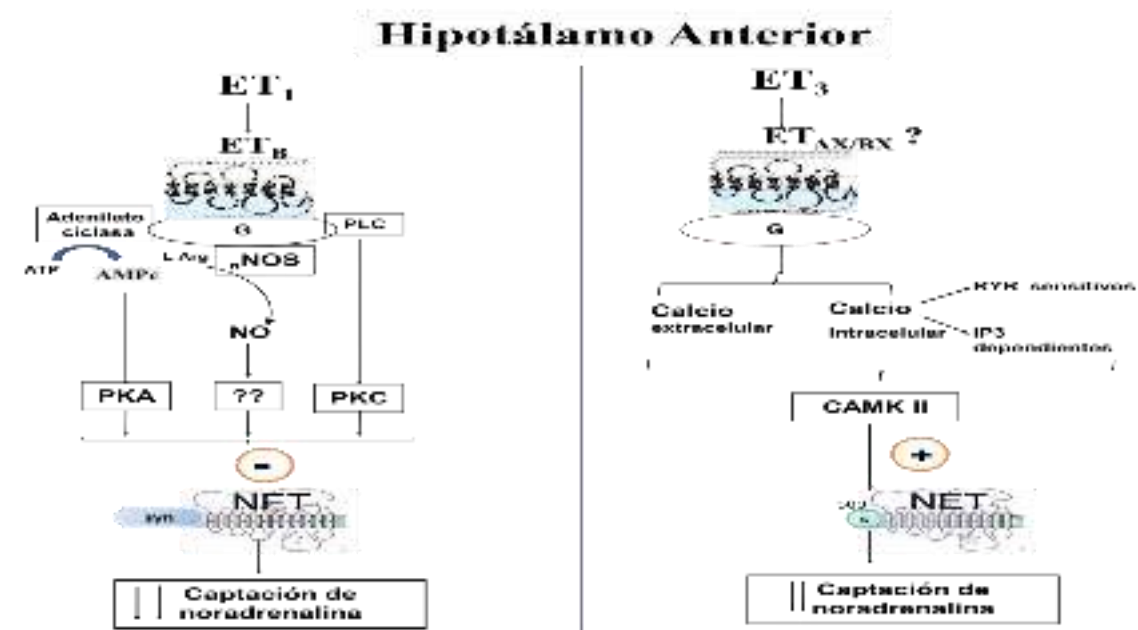


Figura 45: Mecanismos sugeridos a través de los cuales las endotelina-1 y -3 (ET-1 y ET-3) modulan la actividad del transportador neuronal de noradrenalina (NET) en el hipotálamo anterior.

En el Hipotálamo Posterior:

I- La ET-1 (Figura 46):

- ✓ Disminuyen la captación neuronal de NA a expensas de la reducción en la actividad de el NET como consecuencia de una disminución en los sitios de unión (B_{max}), sin modificarse la K_d. Esto es consecuencia de un incremento en la internalización del transportador.
- ✓ El efecto inhibitorio de la ET-1 es mediado por el receptor ET_B unido a proteína G.
- ✓ Involucra diferentes vías intracelulares: NOS neuronal, PKA y PKC.

II- La ET-3 (Figura 46):

- ✓ Disminuyen la captación neuronal de NA a expensas de la reducción en la actividad de el NET como consecuencia de una disminución en los sitios de unión (B_{max}), sin modificarse la K_d . Esto es consecuencia de un incremento en la internalización del transportador.
- ✓ Ejercería su efecto a través de la activación de un receptor atípico o no convencional el cual está acoplado a una proteína G.
- ✓ Involucra diferentes vías intracelulares: NOS neuronal, PKA y PKC.

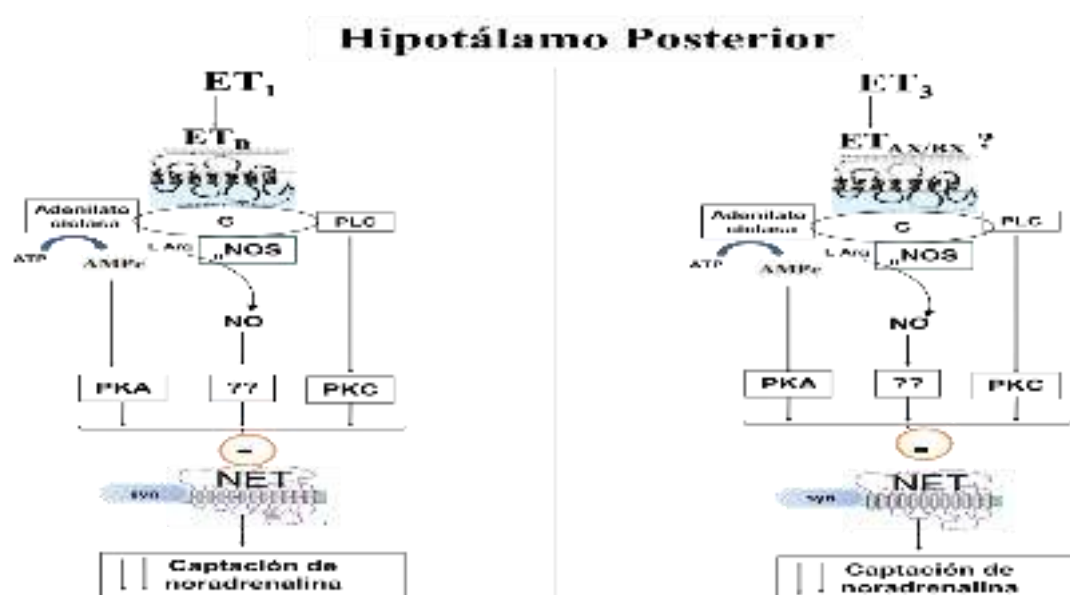


Figura 46: Mecanismos sugeridos a través de los cuales las endotelina-1 y -3 (ET_1 y ET_3) modulan la actividad del transportador neuronal de noradrenalina (NET) en el hipotálamo posterior.

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral sumado a los trabajos previos de nuestro grupo permiten demostrar contundentemente que tanto la ET_1 como la ET_3 se comportan como neuromoduladores de la transmisión noradrenérgica en el HA y HP, de animales normotensos, a través de la regulación de tres procesos importantes:

- La actividad del NET (datos aportados en la presente Tesis doctoral),

- La regulación de la liberación neuronal de NA (*di Nunzio y col., 2002, 2004; Jaureguiberry y col., 2004*) y
- La actividad y expresión de la enzima clave de la biosíntesis de CAs, la TH (*Morgazo y col., 2005; Perfume y col., 2007, 2008*).

Por lo tanto, y a la luz de todos estos resultados, podemos inferir que los efectos producidos por las ETs a nivel central sobre la fisiología cardiovascular son consecuencia de la reducción en la simpatoinhibición a nivel del HA y un incremento de la simpatoexcitación del HP. Todo esto daría respuesta al incremento de la actividad simpática central, producido por las ETs, que fuera observado por diversos autores.

Referencias bibliográficas

- Adam W, Oaks, Anita Sidhu. Synuclein modulation of monoamine transporters. FEBS Letters 2011.
- AbdAlla S, Abdel-Baset A, Lother H, el Massiery A, Quitterer U. Mesangial AT1/B2 receptor heterodimers contribute to angiotensin II hyperresponsiveness in experimental hypertension. J Mol Neurosci. 26(2-3):185-92.2005.
- Abramoff T, Guil MJ, Morales VP, Hope SI, Soria C, Bianciotti LG, Vatta MS. Enhanced assymetrical noradrenergic transmission in the olfactory bulb of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. Neurochem Res. 2013 Oct;38(10):2063-71. doi: 10.1007/s11064-013-1114-0. Epub 2013 Jul 26.
- Agarwal A, Halvorson LM, Legradi G. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) mimics neuroendocrine and behavioral manifestations of stress: Evidence for PKA-mediated expression of the corticotropin-releasing hormone (CRH) gene. Brain Res Mol Brain Res. 138(1):45-57. 2005.
- Akesson T, Micevich PE. Sex steroid regulation of thachykinin peptides in neuronal circuitry mediating reproductive functions. In "Neurobiological Effects of Sex Steroid Hormones". Cambridge University Press, Cambridge, UK. (Micevych, PE, Hammer, Eds), pp. 207-33. 1995.
- Annamalai B, Mannangatti P, Arapulisamy O, Ramamoorthy S, Jayanthi LD. Involvement of threonine 258 and serine 259 motif in amphetamine-induced norepinephrine transporter endocytosis. J Neurochem. 2010 Oct;115(1):23-35.
- Ansah, T.A., Ramamoorthy, S., Montanez, S., Daws, L.C., Blakely, R.D Calcium-dependent inhibition of synaptosomal serotonin transport by the alpha2-adrenoreceptor agonist 5-bromo-N-[4,5-dihydro-1H-imidazol-2-yl]-6-quinoxalinamine (UK14304). J. Pharmacol. Exp. Ther. 305,956-965., 2003.
- Andersen, J., Kristensen, A.S., Bang-Andersen, B., Stromgaard, K. Recent advances in the understanding of the interaction of antidepressant drugs with serotonin and norepinephrine transporters. Chem. Commun. 3677-3692. 2009.
- Ando K, Hirata Y, Togashi K, Kawakami M, Marumo, F. 1991. Endothelin-1-and endothelin-3-like immunoreactivity in human cerebrospinal fluid. J Cardiovasc Pharmacol. 17, S434-6.
- Andreis PG, Neri G, Tortorella C, Aragona F, Rossi GP, Nussdorfer GG Mechanisms transducing the aldosterone secretagogue signal of endothelins in the human adrenal cortex. Peptides. 23(3):561-6. 2002.
- Apparsundaram S, Galli A, DeFelice LJ, Hartzell HC, Blakely RD. Acute regulation of norepinephrine transport: I. Protein kinase C-linked muscarinic receptors influence transport capacity and transporter density in SK-N-SH cells. J. Pharmacol. Exp. Ther. 287:733-43. 1998.
- Apparsundaram S. Function and regulation of monoamine transporters: focus on the norepinephrine transporter. CNS Spectr. 6(8):671-4, 677-8. 2001.
- Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. Nature 348: 730-732, 1990
- Axelrod J. The Uptake and Release of Catecholamines and the Effect of Drugs Progress in Brain Research, Volume 8. Pages 81-89. 1964
- Backs, J., Bresch, E., Lutz, M., Kristen, A.V., Haass, M. Endothelin-1 inhibits the neuronal norepinephrine transporter in hearts of male rats, Cardiovasc. Res. 67, 283-290. 2005
- Bai D, del Corral C, Srinivas M, Spray DC. Block of specific gap junction channel subtypes by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB). J Pharmacol Exp Ther. 319(3):1452-8. 2006.
- Barakat Y, Pape JR, Boutahricht M, El Ouezani S, Alaoui A, Chaigniau M, Tramu G, Magoul R. Immunocytochemical detection of cholecystokinin and corticotrophin-releasing hormone neuropeptides in the hypothalamic paraventricular nucleus of the jerboa (Jaculus orientalis): modulation by immobilisation stress. J Neuroendocrinol. 18(10):767-75. .2006
- Battistini B, Filep JG, Cragoe EJ Jr, Fournier A, Sirois P. A role for Na⁺/H⁺ exchange in contraction of guinea pig airways by endothelin-1 in vitro. Biochem Biophys Res Commun.175 (2):583-8. 1991.

- Bauman AL, Apparsundaram S, Ramamoorthy S, Wadzinski BE, Vaughan RA, Blakely RD. Cocaine and antidepressant-sensitive biogenic amine transporters exist in regulated complexes with protein phosphatase. *A. J. Neurosci.* 20:7571–78; 2000.
- Bauman PA, Blakely RD. Determinants within the C terminus of the human norepinephrine transporter dictated transporter trafficking, stability, and activity. *Arch Biochem Biophys* 404:80–91. 2002.
- Belloni AS, Pacheco YG, Markowska A, Andreis PG, Meneghelli V, Malendowicz LK, Nussdorfer GG. Distribution and functional significance of the endothelin receptor subtypes in the rat adrenal gland. *Cell Tissue Res.* 288(2):345-52. 1997.
- Benjamin L, Levy MJ, Lasalandra MP, Knight YE, Akerman S, Classey JD, Goadsby PJ. Hypothalamic activation after stimulation of the superior sagittal sinus in the cat: a Fos study. *Neurobiol Dis.* 2004 Aug;16(3):500-5.
- Blakely R. D. and Bauman A. L. Biogenic amine transporters: regulation in flux. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10, 328–336. 2000
- Blakely R. Overview: A Rare Opportunity or Just One Less Reason to Be Depressed. *Neuron*, Vol. 48, 701–706. 2005.
- Blakely y Edwards. Vesicular and Plasma Membrane Transporter for Neurotransmitters. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012;4:
- Boesen EI. Endothelin ETB receptor heterodimerization: beyond the ETA receptor. *Kidney Int.* 74(6):693-4. Review, 2008
- Boesen EI. Endothelin receptors, renal effects and blood pressure. *Current Opinion in Pharmacology* 21:25–34 2015,
- Bönisch, H., Brüss, M. The norepinephrine transporter in physiology and disease. *Handb. Exp. Pharmacol.* 175, 485–524, 2006
- Bönisch, H., Hammermann, R., Brüss, M. Role protein kinase C and second messengers in regulation of norepinephrine transporter. *Adv. Pharmacol.* 42, 183-186. 1998.
- Boutrel B. A neuropeptide-centric view of psychostimulant addiction. *Br J Pharmacol.* 154(2):343-57. 2008.
- Braasch I, Volf JN, Scharl M. The endothelin system: evolution of vertebrate-specific ligand-receptor interactions by three rounds of genome duplication. *Mol Biol Evol* 26: 783–789, 2009.
- Bredt DS, Glatt CE, Hwang PM, Fotuhi M, Dawson TM, Snyder SH. Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron.* 7(4):615-24. 1991.
- Briet M, Schiffrin EL. Vascular actions of aldosterone. *J Vasc Res.* 2013;50(2):89-99b Review. 2012
- Brown MJ, Davies DS, Dollery CT. Quantitative analysis of noradrenaline clearance [proceedings]. *Br J Pharmacol.* 1979
- Brüss, M., Pörzgen, P., Bryan-Lluka, L.J., Bönisch H. The rat norepinephrine transporter: molecular cloning from PC12 cells and functional expression, *Brain Res. Mol. Brain Res.* 52, 257-262. 1997
- Bryan-Lluka, L.J., Paczkowski, F.A., Bonish, H. Effects of short- and long-term exposure to c-AMP and c-GMP on the noradrenaline transporter. *Neuropharmacology* 40, 607–617. 2001.
- Burkhardt, P., Hattendorf, D. A., Weis, W. I. & Fasshauer, D. *EMBO J.* 27, 923–933. (2008)
- Burkhardt, P., Stegmann, C. M., Cooper, B., Kloepper, T. H., Imig, C., Varoqueaux, F., Wahl, M. C. & Fasshauer, D. (2011). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 108, 15264–15269.
- Burke SL, Prior LJ, Lukoshkova EV, Lim K, Barzel B, Davern PJ, Armitage JA, Head GA. Reduced preprandial dipping accounts for rapid elevation of blood pressure and renal sympathetic nerve activity in rabbits fed a high-fat diet. *Chronobiol Int.* 2013 Jun;30(5):726-38. doi: 10.3109/07420528.2013.784771. Epub 2013 May 20.
- Bunn SJ, Sim AT, Herd LM, Austin LM, Dunkley PR. Tyrosine hydroxylase phosphorylation in bovine adrenal chromaffin cells: the role of intracellular Ca²⁺ in the histamine H1 receptor-stimulated phosphorylation of Ser8, Ser19, Ser31, and Ser40. *J. Neurochem.* 64, 1370–8. 1995.
- Calasso M, Parmeggiani PL. Carotid blood flow during REM sleep. *Sleep.* 2008 May;31(5):701-7.

- Campos F, Alfonso M, Vidal L, Faro LR, Durán R. Mediation of glutamatergic receptors and nitric oxide on striatal dopamine release evoked by anatoxin-a. An in vivo microdialysis study. *Eur J Pharmacol.* 548(1-3):90-8. 2006.
- Canteras NS, Chiavegatto S, Valle LE, Swanson LW. Severe reduction of rat defensive behavior to a predator by discrete hypothalamic chemical lesions. *Brain Res. Bull.* 44: 297-305. 1997.
- Cardell LO, Uddman R, Edvinsson L. Evidence for multiple endothelin receptors in the guinea-pig pulmonary artery and trachea. *Br J Pharmacol.* 105(2):376-80. . 1992.
- Carlson GC, Slawewski ML, Lancaster E. Distribution and activation of intracellular calcium stores in cultures olfactory bulb neurons. *J. Neurophysiol.* 78: 2176-85. 1997
- Carr DB, Surmeier DJ. M1 muscarinic receptor modulation of Kir2 channels enhances temporal summation of excitatory synaptic potentials in prefrontal cortex pyramidal neurons. *J Neurophysiol.* 97(5):3432-8. 2007.
- Carrington, E.F., Desautels, M., Naylor, J.M Beta-adrenergic stimulated lipolysis in pony adipocytes is exclusively via a beta2-subtype and is not affected by lactation. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 136,311-320., 2003.
- Cavdar S, Onat F, Aker R, Sehirli U, San T, Yananli HR. The afferent connections of the posterior hypothalamic nucleus in the rat using horseradish peroxidase. *J. Anat.*, 198:463-472. . 2001.
- Chen RH, Abate C, Blenis J. Phosphorylation of the c-Fos transrepression domain by mitogen-activated protein kinase and 90-kDa ribosomal S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90:10952-6. 1993.
- Chen YA, Scheller RH. SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Feb;2(2):98-106. Review. 2001
- Chou SY, Porush JG. Renal actions of endothelin-1 and endothelin-3: interactions with the prostaglandin system and nitric oxide. *Am J Kidney Dis.* 1;26(1):116-23. 1995.
- Chung TW, Koo BS, Kim KO, Jeong HS, Kim MG, Chung KH, Lee IS, Kim CH. *Salviae Miltiorrhizae BGE Radix* increases rat striatal K(+)-stimulated dopamine release and activates the dopamine release with protection against hydrogen peroxide-induced injury in rat pheochromocytoma PC12 cells. *Neurochem Res.* 31(1):109-20. 2006.
- Clerk A, Kemp TJ, Harrison JG, Mullen AJ, Barton PJ, Sugden PH. Up-regulation of c-jun mRNA in cardiac myocytes requires the extracellular signal-regulated kinase cascade, but c-Jun N-terminal kinases are required for efficient up-regulation of c-Jun protein. *Biochem J.* 368(Pt 1):101-10. 2002.
- Comoli E, Ribeiro-Barbosa ER, Canteras NS. Afferent connections of the dorsal premammillary nucleus. *J. Comp. Neurol.* 423: 83-98. 2000.
- Conrad LC, Leonard CM, Pfaff DW. Connections of the median and dorsal raphe nuclei in the rat: An autoradiographic and degeneration study. *J. Comp. Neurol.* 156: 179-205. 1974.
- Cottrell EC, Cripps RL, Duncan JS, Barrett P, Mercer JG, Herwig A, Ozanne SE. Developmental changes in hypothalamic leptin receptor: relationship with the postnatal leptin surge and energy balance neuropeptides in the postnatal rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 296(3):R631-9. 2009.
- Dampney RA, Horiuchi J, Killinger S, Sheriff MJ, Tan PS, McDowall LM. Long-term regulation of arterial blood pressure by hypothalamic nuclei: some critical questions. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 32(5-6):419-25. 2005.
- Dashwood MR, Loesch A. Endothelin-1 as a neuropeptide: neurotransmitter or neurovascular effects? *J Cell Commun Signal*, 2009. Daubner SC, Lohse DL, Fitzpatrick PF. Expression and characterization of catalytic and regulatory domains of rat tyrosine hydroxylase. *Protein Sci.* 2(9):1452-60. 1993.
- Davenport A. International Union of Pharmacology. XXIX. Update on Endothelin Receptor Nomenclatura. *Pharmacol Rev.*54(2):219-26, 2002
- de Lecea L, Jones BE, Boutrel B, Borgland SL, Nishino S, Bubser M, DiLeone R. Addiction and arousal: alternative roles of hypothalamic peptides. *J Neurosci.* 26(41):10372-5. 2006.
- DeQuattro V, Nagatsu T, Maronde R, Alexander N. "Catecholamine synthesis in rabbits with neurogenic". *Hypertension. Circ Res;* 24: 545-555. 1969

- Di Nunzio AS, Jaureguiberry MS, Rodano V, Bianciotti LG, Vatta MS. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* Sep;283(3):R615-22. Endothelin-1 and -3 diminish neuronal NE release through an NO mechanism in rat anterior hypothalamus. 2002
- Di Nunzio, Legaz G, Rodano V, Bianciotti LG, Vatta MS. Modulatory effect of endothelin-1 and -3 on neuronal norepinephrine release in the rat posterior hypothalamus. *Regul Pept.*;118(1-2):51-9. 2004
- Dinerman JL, Dawson TM, Schell MJ, Snowman A, Snyder SH. Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91(10):4214-8. 1994.
- D'Orléans-Juste P, Honoré JC, Carrier E, Labonté J. Cardiovascular diseases: new insights from knockout mice. *Curr Opin Pharmacol.* 3(2):181-5. Review. 2003, (a)
- D'Orléans-Juste P, Labonté J, Bkaily G, Choufani S, Plante M, Honoré JC. Function of the endothelin receptor in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Pharmacol Ther.* 95(3):221-38. Review. 2002 .
- D'Orléans-Juste P, Plante M, Honoré JC, Carrier E, Labonté J. Synthesis and degradation of endothelin-1. *Can J Physiol Pharmacol.* 81(6):503-10. Review. 2003 (b)
- Drevets WC, Price JL, Furey ML. Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression. *Brain Struct Funct.* 213(1-2):93-118. Review. 2008
- Du W, Stern JE, Filosa JA. *J Neurosci.* 2015 Apr 1;35(13):5330-41. Neuronal-derived nitric oxide and somatodendritically released vasopressin regulate neurovascular coupling in the rat hypothalamic supraoptic nucleus. 2015
- Duale H, Waki H, Howorth P, Kasparov S, Teschemacher AG & Paton JFR. "Restraining influence of A2 neurones in chronic control of blood pressure in SHR". *Cardiovasc Res* 76, 184–193. 2007
- Duan PG, Kawano H, Masuko S. Collateral projections from the subfornical organ to the median preoptic nucleus and paraventricular hypothalamic nucleus in the rat. *Brain Res.* 10;1198:68-72. 2008
- Duchene J, Ahluwalia A. The kinin B(1) receptor and inflammation: new therapeutic target for cardiovascular disease. *Curr Opin Pharmacol.* Jan 3. 9(2):125-31. 2009.
- Ehrenreich H, Lange M, Near KA, Anneser F, Schoeller LA, Schmid R, Winkler PA, Kehrl JH, Schmiedek P, Goebel FD. 1992. Long term monitoring of immunoreactive endothelin-1 and endothelin-3 in ventricular cerebrospinal fluid, plasma, and 24 h urine of patients with subarachnoid hemorrhage, *Res. Exp. Med.* 192:257- 68.
- Eisenhofer, G. The role of neuronal and extraneuronal plasma membrane transporter in the inactivation of peripheral catecholamines, *Pharmacol. Ther.* 91, 35-62. 2001c
- Eisenhofer G, Kopin IJ, Goldstein DS. Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine. *Pharmacol Rev.* 2004 Sep;56(3):331-49. Review.
- Emoto N, Yanagisawa M. 1995. Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J Biol Chem.* 270(25):15262-8.
- Ericson H, Blomqvist A, Kohler C. Origin of neuronal inputs to the region of the tuberomammillary nucleus of the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 311: 45-64. 1991..
- Evans NJ, Walker JW. Endothelin receptor dimers evaluated by FRET, ligand binding, and calcium mobilization. *Biophys J.* 95(1):483-92, 2008.
- Fasshauer, D. and M. Margittai, A transient N-terminal interaction of SNAP-25 and syntaxin nucleates SNARE assembly. *J Biol Chem,* 2004
- Fernández BE, Leder M, Fernández G, Bianciotti LG, Vatta MS. 1997. Atrial natriuretic factor modifies the biosynthesis and turn over of norepinephrine in the rat adrenal medulla. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 238: 343-346.
- Fernández BE, Vatta MS., Bianciotti LG, Martínez Seeber A. Atrial natriuretic peptide: Effects on uptake and intracellular distribution of Norepinephrine in Hypothalamus. *Pharmacol. (Life Sci. Adv.)* 1990.9. 525- 533

- Ferro, A., Coash, M., Yamamoto, T., Rob, J., Ji, Y., Queen, L. Nitric oxide-dependent beta2-adrenergic dilation of rat aorta is mediated through activation of both protein kinase A and Akt. *Br. J. Pharmacol.* 143,397-403. 2004.
- Fitzpatrick PF (Mechanism of aromatic amino acid hydroxylation. *Biochemistry* 42(48):14083–14091. 2003)
- Filosa JA, Naskar K, Perfume G, Iddings JA, Biancardi VC, Vatta MS, Stern JE. Endothelin-mediated calcium responses in supraoptic nucleus astrocytes influence magnocellular neurosecretory firing activity. *J. Neuroendocrinol.* 24(2):378-92. 2012.
- Flatmark T, Stevens RC. Structural insight into the aromatic amino acid hydroxylases and their disease related mutant forms. *Chem. Rev.* 99:2137-60. 1999.
- Flatmark T. Catecholamine biosynthesis and physiological regulation in neuroendocrine cells. *Acta Physiol Scand.* 168: 1–17. 2000.
- Flak JN, Myers B, Solomon MB, McKlveen JM, Krause EG, Herman JP. Role of paraventricular nucleus-projecting norepinephrine/epinephrine neurons in acute and chronic stress. *Flak JN, Myers B, Solomon MB, McKlveen JM, Krause EG, Herman JP. Eur J Neurosci.* 2014 Jun;39(11):1903-11. doi: 10.1111/ejn.12587. Epub 2014 Apr 26.
- Footes SI, Bloom FE, Aston-Jones G. Nucleus locus ceruleus: new evidence of anatomical and physiological specificity. *Physiol. Rev.*, 63:844-914, 1983.
- Fortaleza EA, Scopinho AA, Corrêa FM. Paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus mediate cardiovascular responses evoked by the microinjection of noradrenaline into the medial amygdaloid nucleus of the rat brain. *Neuroscience.* 219:157-65. 2012.
- Freissmuth M, Waldhoer M., Bojill-Cardona E., Nanoff C. G protein antagonists. *Trends Pharmacol Sci.* 20:237-45. 1998.
- Fu Y, Han J, Ishola T, Scerbo M, Adwanikar H, Ramsey C, Neugebauer V. PKA and ERK, but not PKC, in the amygdala contribute to pain-related synaptic plasticity and behavior. *Mol Pain.*;4:26-9. 2008.
- Fujisaki H, Ito H, Hirata Y, Tanaka M, Hata M, Lin M, Adachi S, Akimoto H, Marumo F, Hiroe M. Natriuretic peptides inhibit angiotensin II-induced proliferation of rat cardiac fibroblasts by blocking endothelin-1 gene expression. *J Clin Invest.* 96(2):1059-65. 1995.
- Fujita Y, Sasaki T, Fukui K, Kotani H, Kimura T, Hata Y, Südhof TC, Scheller RH, Takai Y. Phosphorylation of Munc-18/n-Sec1/rbSec1 by protein kinase C: its implication in regulating the interaction of Munc-18/n-Sec1/rbSec1 with syntaxin. *J Biol Chem.* Mar 29;271(13):7265-8. 1996
- Fullerton, D.A., Agrafojo, J., McIntyre Jr, R.C., Pulmonary vascular smooth muscle relaxation by cAMP-mediated pathways. *J. Surg. Res.* 61,444-448. 1996.
- Garcia-Segura LM, Lorenz B, DonCarlos LL. The role of glia in the hypothalamus: implications for gonadal steroid feedback and reproductive neuroendocrine output. *Reproduction.* 135(4):419-29. 2008.
- Garrido MR, Israel A. 2004. Endothelin-3 stimulates phosphoinositide hydrolysis in the subfornical organ and median eminence of the rat brain. *Brain Res Bull.* 33(6):683-8.
- Gasic S, Wagner OF, Vierhapper H, Nowotny P, Waldhäusl W. Regional hemodynamic effects and clearance of endothelin-1 in humans: renal and peripheral tissues may contribute to the overall disposal of the peptide. *J Cardiovasc Pharmacol.* 19 (2):176-80. 1992.
- Gebke E, Müller AR, Pehl U, Gerstberger R. 2000. Astrocytes in sensory circumventricular organs of the rat brain express functional binding sites for endothelin. *Neuroscience.* 97(2):371-81.
- Gerona R, Larsen E, Kowalchuk J. y Martin T. The C Terminus of SNAP25 Is Essential for Ca²⁺-dependent Binding of Synaptotagmin to SNARE Complexes
- Gether U, Andersen PH, Larsson OM and Schousboe A. Neurotransmitter transporters: molecular function of important drug targets. *TRENDS in Pharmacological Sciences* Vol.27 No.7 2006
- Gobert, A., Billiras, R., Cistarelli, I., Millan, M.J., Quantification and pharmacological characterization of dialysate levels of noradrenaline in the striatum of freely-moving rats: release from adrenergic terminals and modulation by alpha2-autoreceptors. *J. Neurosci. Methods* 140,141-152. 2004.
- Goraca A. New views on the role of endothelin. *Endocr Regul.* 36(4):161-7. Review, 2002

- Gössl M, Lerman A. Endothelin Beyond a Vasoconstrictor. *Circulation*. 113:1156-1158., 2008.
- Goto K.. Basic and therapeutic relevance of endothelin-mediated regulation. *Biol Pharm Bull*. 24(11):1219-30. Review. 2001
- Gouaux E. Review. The molecular logic of sodium-coupled neurotransmitter transporters. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* Jan 27;364(1514):149-54. 2009.
- Granger JP. Endothelin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 285(2):R298-301, 2003
- Gregan B, Jurgensen J, Papsdorf G, Furkert J, Schaefer M, y col.. Ligand-dependent differences in the internalization of endothelin A and endothelin B receptor heterodimers. *J Biol Chem*.279:27679–27687. 2004
- Grindstaff RR, Cunningham JT. 2001 Cardiovascular regulation of vasopressin neurons in the supraoptic nucleus. *Exp Neurol*. 171(2):219-26.
- Grindstaff RR, Cunningham JT. 2001. Lesion of the perinuclear zone attenuates cardiac sensitivity of vasopressinergic supraoptic neurons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 280(3):R630-8.
- Grippio AJ, Moffitt JA, Johnson AK. "Cardiovascular alterations and autonomic imbalance in an experimental model of depression". *Am. J. Physiol.*, 282:1333-1341; 2008.
- Grippio AJ, Johnson AK. Stress, depression and cardiovascular dysregulation: a review of neurobiological mechanisms and the integration of research from preclinical disease models. *Stress*. 2009 Jan;12(1):1-21. Review.
- Gu GB, Simerly RB. Projections of the sexually dimorphic anteroventral periventricular nucleus in the female rat. *J. Comp. Neurol*. 384:142-64. 1997.
- Gurevich VV, Gurevich EV. How and why do GPCRs dimerize? *Trends Pharmacol Sci* 29: 234–240, 2008,
- Guyenet PG. The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev*. 7: 335–46. 2006.
- Hahn, M.K., Blakely, R.D. The functional impact of SLC6 transporter genetic variation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 47, 401-441. 2007.
- Harada N, Himeno A, Shigematsu K, Sumikawa K, Niwa M. Endothelin-1 binding to endothelin receptors in the rat anterior pituitary gland: possible formation of an ETA-ETB receptor heterodimer. *Cell Mol Neurobiol*. 22(2):207-26. 2002.
- Harris RC, Zhang MZ. Dopamine, the kidney, and hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2012 Apr;14(2):138-43. doi: 10.1007/s11906-012-0253-z. Review.
- Hatae N, Aksentijevich N, Zemkova HW, Kretschmannova K, Tomic M, Stojilkovic SS., Cloning and functional identification of novel endothelin receptor type A isoforms in pituitary *Mol Endocrinol*. 21(5):1192-204, 2007.
- Haynes WG, Webb DJ. Endothelin as a regulator of cardiovascular function in health and disease. *J Hypertens*. 16(8):1081-98. 1998.
- He S, Prasanna G, Yorio T Endothelin-1-mediated signaling in the expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in astrocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007 Aug;48(8):3737-45.
- He L, Vasiliou K y Nebert D. The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins Introduction; *Hum Genomics*. Analysis and update of the human solute carrier (SLC) gene Superfamily. 2009
- Hein, T.W., Zhang, C., Wang, W., Kuo, L Heterogenous beta2-adrenoreceptor expression and dilation in coronary arterioles across the left ventricular wall. *Circulation* 110,2708-2712. ., 2004.
- Henrich, W.L., Campbell, W.B The systemic adrenergic pathway to renin secretion: relationships with the renal prostaglandin system. *Endocrinology* 113,2247-2254., 1983.
- Hess JA, Buchanan FG, Ryder S, Exton JH. Altered activation of phospholipase D by lysophosphatidic acid and endothelin-1 in mouse embryo fibroblasts lacking phospholipase C-gamma1. *Cell Signal*. 12(1):37-45. 2000.
- Hickey KA, Rubanyi G, Paul RJ, Highsmith RF. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 248(5 Pt 1):C550-6. 1985.

- Higa-Taniguchi KT, Silva FC, Silva HM, Michelini LC, Stern JE. Exercise training-induced remodeling of paraventricular nucleus (nor)adrenergic innervation in normotensive and hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 292(4):R1717-27. 2007.
- Hiley RC. Endothelin receptor ligands. *Neurotransmission* 11:1-12, 1995.
- Hill JW, Elmquist JK, Elias CF. Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 294(5):E827-32. 2008.
- Hirata Y, Emori T, Eguchi S, Kanno K, Imai T, Ohta K, Marumo F. Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells. *J Clin Invest.* 91(4):1367-73. 1993.
- Hoang D, Macarthur H, Gardner A, Westfall TC. Endothelin-induced modulation of neuropeptide Y and norepinephrine release from the rat mesenteric bed. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*;283(4):H1523-30. 2002.
- Höcht C., Opezzo J, Taira CA . Bloqueo betaadrenergico hipotalámico: efectos cardiovasculares y acciones sobre la neurotransmisión aminérgica. *Revista argentina de Cardiología*, VOL. 70, N° 3, 2002
- Höcht C., Opezzo J, Gironachi M, Peña C, Taira CA. Efectos hipotalámicos de la angiotensina-[1-7] en ratas con coartación aórtica. *Revista argentina de Cardiología*, .VOL 73 N° 5. 2005
- Hohmann S, Hohm E, Treutlein J, Blomeyer D, Jennen-Steinmetz C, Schmidt MH, Esser G, Banaschewski T, Brandeis D, Laucht M. Association of norepinephrine transporter (NET, SLC6A2) genotype with ADHD-related phenotypes: Findings of a longitudinal study from birth to adolescence. *Psychiatry Res.* 226(2-3):425-33. doi: 10.1016/j.psychres.2014.12.029. 2015
- Holton KL, Loder MK, Melikian HE. Nonclassical, distinct endocytic signals dictate constitutive and PKC-regulated neurotransmitter transporter internalization. *Nat Neurosci.*;8(7):881-8. 2005
- Horinouchi T, Terada K, Higashi K y Miwa S. Endothelin Receptor Signaling: New Insight Into Its Regulatory Mechanisms. *J Pharmacol Sci* 123, 0- 16. 2013
- Horie K, Morita A, y Yokogoshi H. Endothelin-1 and endothelin-3 modulate dopaminergic neurons through different mechanisms. *Life Sciences*, Vol. S7, No. 8, pp. 735-741, 1995
- Houde M, Labonté J, D'Orléans-Juste P. Peptide and non-peptide antagonists targeting endothelin receptors in physiology and pathology. *Curr Pharm Des.* 2011;17(25):2613-25. Review.
- Hu R, He ML, Hu H, Yuan BX, Zang WJ, Lau CP, Tse HF, Li GR. Characterization of calcium signaling pathways in human preadipocytes. *J Cell Physiol.* 220(3):765-70. 2009.
- Huang CJ¹ Webb HE, Zourdos MC, Acevedo EO. Cardiovascular reactivity, stress, and physical activity. *Front Physiol.* 2013 Nov 7;4:314.
- Hyndman KA, Miyamoto MM, Evans DH. Phylogeny, taxonomy, and evolution of the endothelin receptor gene family. *Mol Phylogen Evol* 52: 677–687, 2009.
- Hynynen MM, Khalil RA The vascular endothelin system in hypertension--recent patents and discoveries. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov.*1(1):95-108. Review. 2006.
- Imadisetty K, Madura JD. A review of monoamine transporter-ligand interactions. *Curr Comput Aided Drug Des.* 2013 Dec;9(4):556-68. 2013
- Ishikawa T, Yanagisawa M, Kimura S, Goto K, Masaki T. Positive chronotropic effects of endothelin, a novel endothelium-derived vasoconstrictor peptide. *Pflugers Arch.* 413(1):108-10. 1988.
- Itoh H, Toyohira Y, Ueno S, Saeki S, Zhang H, Furuno Y, Takahashi K, Tsutsui M, Hachisuka K, Yanagihara N. Upregulation of norepinephrine transporter function by prolonged exposure to nicotine in cultured bovine adrenal medullary cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 382:235-243, 2010.
- Iversen, L. Neurotransmitter transporters and their impact on the development of psychopharmacology, *Br. J. Pharmacol.* 147, S82-S88. , 2006.
- Iwai-Kanai E, Hasegawa K. Intracellular signaling pathways for norepinephrine- and endothelin-1-mediated regulation of myocardial cell apoptosis. *Mol Cell Biochem.* 259(1-2):163-8. 2004.
- Jaureguiberry MS, di Nunzio AS, Dattilo MA, Bianciotti LG, Vatta MS. Endothelin 1 and 3 enhance neuronal nitric oxide synthase activity through ETB receptors involving multiple signaling pathways in the rat anterior hypothalamus. *Peptides.* 25(7):1133-8. 2004.

- Jayanthi LD, Samuvel DJ, Ramamoorthy S. Regulated internalization and phosphorylation of the native norepinephrine transporter in response to phorbol esters. Evidence for localization in lipid rafts and lipid raft-mediated internalization. *J. Biol. Chem.* 279:19315–26. 2004.
- Jayanthi LD, Ramamoorthy S. Regulation of Monoamine Transporters: Influence of Psychostimulants and Therapeutic Antidepressants. 2005
- Jayanthi LD, Annamalai B, Samuvel DJ, Gether U, Ramamoorthy S. Phosphorylation of the norepinephrine transporter at threonine 258 and serine 259 is linked to protein kinase C-mediated transporter internalization. *J Biol Chem.* 2006 Aug 18;281(33):23326-40. 2006
- Jena BP. Role of SNAREs in membrane fusion *Adv Exp Med Biol.*;713:13-32. Review. 2011
- Jiang MH, Eriksson L, Olsson Y. Immunohistochemical evidence of endothelin-1 in human choroid plexus. *Acta Neuropathol.* 84:457-60. 2000..
- Juan CC, Chang CL, Lai YH, Ho LT. Endothelin-1 induces lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 288(6):E1146-52. 2005.
- Juan CC, Chuang TY, Chang CL, Huang SW, Ho LT. Endothelin-1 regulates adiponectin gene expression and secretion in 3T3-L1 adipocytes via distinct signaling pathways. *Endocrinology.* 148(4):1835-42. 2007.
- Khalil RA. Modulators of the vascular endothelin receptor in blood pressure regulation and hypertension. *Curr Mol Pharmacol.* 2011 Nov;4(3):176-86. Review
- Kallakuri S, Kreipke CW, Schafer PC, Schafer SM, Rafols JA. Brain cellular localization of endothelin receptors A and B in a rodent model of diffuse traumatic brain injury. *Neuroscience.* 2010.
- Karne S, Jayawickreme CK, Lerner MR. Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ETC receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J Biol Chem.* 268(25):19126-33. 1993.
- Karwatowska-Prokopczuk E, Wennmalm A. 1990. Effects of endothelin on coronary flow, mechanical performance, oxygen uptake, and formation of purines and on outflow of prostacyclin in the isolated rabbit heart. *Circ Res.* 66(1):46-54.
- Kasparov, S., Teschemacher, A.G. Altered central catecholaminergic transmission and cardiovascular disease. *Exp. Physiol.* 93.6, 725-740. 2008
- Kawanabe Y, Masaki T, Hashimoto N. Involvement of phospholipase C in endothelin 1-induced stimulation of Ca⁺⁺ channels and basilar artery contraction in rabbits. *J Neurosurg.* 105(2):288-93. 2006
- Kawanabe Y, Nauli SM Involvement of extracellular Ca²⁺ influx through voltage-independent Ca²⁺ channels in endothelin-1 function. *Cell Signal.* ;17(8):911-6. 16. Review. 2005.
- Kawanabe Y, Nauli SM Endothelin. *Cell Mol Life Sci.* 2011 Jan;68(2):195-203. doi: 10.1007/s00018-010-0518-0. Epub 2010 Sep 17. Review.
- Kawano Y, Yoshida K, Yoshimi H, Kuramochi M, Omae T. The cardiovascular effect of intracerebroventricular endothelin in rats. *J Hypertens Suppl.* 7(6):S22-3. 1989.
- Kaye, D.M., Wiviott, S.D., Kobzik, L., Kelly, R.A., Smith, T.W. S-nitrosothiols inhibit neuronal norepinephrine transport. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 41, H875-H883. 1997.
- Kaye, D.M., Gruskin, S., Smith, A.I., Ester, M.D., 2000. Nitric oxide mediated modulation of transport: identification of a potential target for 5-nitrosylation. *Br. J. Pharmacol.* 130, 1060 – 1064.
- Kedzierski RM, Yanagisawa M. Endothelin system: The double-edge sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 41: 851–76. 2001
- Klammt C, Srivastava A, Eifler N, Junge F, Beyermann M, Schwarz D, Michel H, Doetsch V, Bernhard F. Functional analysis of cell-free-produced human endothelin B receptor reveals transmembrane segment 1 as an essential area for ET-1 binding and homodimer formation. *FEBS J.*;274(13):3257-69, 2007.
- Koizumi S, Kataoka Y, Niwa M, Kumakura K. Endothelin-3 stimulates the release of catecholamine from cortical and striatal slices of the rat. *Neurosci Lett.* 134(2):219-22. 1992.
- Kristensen AS, Andersen J, Jørgensen TN, Sørensen L, Eriksen J, Loland CJ, Strømgaard K, Gether U. SLC6 Neurotransmitter Transporters: Structure, Function, and Regulation. *Pharmacol Rev.* 63(3):585-640. 2011

- Krowicki ZK, Nathan NA, Hornby PJ. Excitatory gastric motor and cardiovascular effects of endothelins in the dorsal vagal complex are mediated through ET(A) receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 282(2):535-42. 1997.
- Kumar VM, Vetrivelan R, Mallick HN. Noradrenergic afferents and receptors in the medial preoptic area: neuroanatomical and neurochemical links between the regulation of sleep and body temperature. *Neurochem Int* 50(6):783-90. 2007.
- Kurokawa K, Yamada H, Ochi J. Topographical distribution of neurons containing endothelin type A receptor in the rat brain. *J Comp Neurol.* 389(2):348-60. 2000.
- Kuwaki T, Kuhihara H, Cao WH, Kurihara Y, Unekawa M, Yazaki Y, Kumada M. Physiological role of brain endothelin in the central autonomic control: from neuron to knock out mouse. *Prog Neurobiol.* 51: 545–579. 1997.
- Kuwaki T, Ling GY, Onodera M, Ishii T, Nakamura A, Ju KH, Cao WH, Kumada M, Kurihara H, Kurihara Y, Yazaki Y, Ohuchi T, Yanagisawa M, Fukuda Y. Endothelin in the central control of cardiovascular and respiratory functions. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 26(12):989-94. 1999.
- Kwok CF, Juan CC, Ho LT. Endothelin-1 decreases CD36 protein expression in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 292(2):E648-52. 2007.
- Lee B, Hiney JK, Pine MD, Srivastava VK, Dees WL. Manganese stimulates luteinizing hormone releasing hormone secretion in prepubertal female rats: hypothalamic site and mechanism of action. *J Physiol.* 578(Pt 3):765-72. 2007.
- Lee LK, Kim JH, Kim MY, Lee JU, Yang SM, Jeon HJ, Lee WD, Noh JW, Kwak TY, Jang SH, Lee TH, Kim B, Kim J. A Review of Signal Transduction of Endothelin-1 and Mitogen-activated Protein Kinase-related Pain for Nanophysiotherapy. *J Phys Ther Sci.* 2014 May;26(5):789-92. doi: 10.1589/jpts.26.789. Epub 2014 May 29. Review
- Lei He1, Konstandinos Vasiliou2, and Daniel W. Analysis and update of the human solute carrier (SLC) gene superfamily. Nebert, 2009
- Levin ER. Mechanisms of disease: Endothelins. *N. Engl. J. Med.*, 333:356-363, 1995.
- Levitan ES. Signaling for vesicle mobilization and synaptic plasticity. *Mol Neurobiol.* 37(1):39-43. 2008.
- Levitt P, Rakic P, Goldman-Rakic P. *Region-specific distribution of catecholamine afferents in primate cerebral cortex: a fluorescence histochemical analysis.* *J Comp Neurol.* 1984
- Levoe A, Dam J, Aoub MA, Guillame JL, Jockers R. Do orphan G protein coupled receptor have ligand-independent functions? New insights from receptor heterodimers. *EMBO Rep* 7: 1094–1098, 2006.
- Li, D.P., Atnip, L.M., Chen, S.R., Pan, H.L. Regulation of synaptic inputs to paraventricular-spinal output neurons by alpha2 adrenergic receptors. *J. Neurophysiol.* 93,393-402..2005.
- Liu Y, Chen X. Cholinergic excitation of dopaminergic cells depends on sequential activation of protein kinase C and the L-type calcium channel in ventral tegmental area slices. *Brain Res.* 1245:41-51. 2008.
- Liu Z, Fei XW, Fang YJ, Shi WJ, Zhang YQ, Mei YA. PLC-dependent intracellular Ca²⁺ release was associated with C6-ceramide-induced inhibition of Na⁺ current in rat granule cells. *J Neurochem.* 106(6):2463-75. 2008.
- Liu L, Cheng J, Li H, Yang L, Qian Q, Wang Y. The possible involvement of genetic variants of NET1 in the etiology of attention-deficit/hyperactivity disorder comorbid with oppositional defiant disorder. *J Child Psychol Psychiatry.* 56(1):58-66 2015
- Loder MK, Melikian HE. The dopamine transporter constitutively internalizes and recycles in a protein kinase C-regulated manner in stably transfected PC12 cell lines. *J Biol Chem.* 13;278(24):22168-74. 2003
- Loesch A. Localisation of endothelin-1 and its receptors in vascular tissue as seen at the electron microscopic level. *Curr Vasc Pharmacol.* ;3(4):381-92. Review. 2005
- Lourenco CM, Kenk M, Beanlands RS, DaSilva JN. Increasing synaptic noradrenaline, serotonin and histamine enhances in vivo binding of phosphodiesterase-4 inhibitor (R)-[¹¹C]rolipram in rat brain, lung and heart. *Life Sci.*;79(4):356-64. 2006
- Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:346- 356, 1951.

- Lu D, Yu K, Paddy MR, Rowland NE, Raizada MK. Angiotensin II regulation of tyrosine hydroxylase gene expression in the neuronal cultures of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Endocrinology*;137:763-72. 1996
- Maccumber MW, Ross CA, Sydner SH. Endothelin in brain: receptor, mitogenesis and biosynthesis in glial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 86:7285-7289, 1990.
- Maguire JJ, Davenport AP. Endothelin receptors and their antagonists. *Semin Nephrol.* 2015 Mar;35(2):125-36. Review. 2011
- Mandela P, Ordway GA The norepinephrine transporter and its regulation. *J Neurochem.* 97(2):310-33. Review, 2006.
- Manepalli, Christopher Surratt, Jeffry D. Madura, and Tammy L. Nolan. Monoamine Transporter Structure, Function, Dynamics, and Drug Discovery: A Computational Perspective. *The AAPS Journal*, Vol. 14, No. 4, 2012
- Manepalli S1, Surratt CK, Madura JD, Nolan TL. Monoamine transporter structure, function, dynamics, and drug discovery: a computational perspective. *AAPS J.* 2012 Dec;14(4):820-31. 2012.
- Marecos C, Ng J, Kurian MA. What is new for monoamine neurotransmitter disorders? *J Inher Metab Dis.* 2014 37(4):619-26. Review. 2014 Apr 3
- Masaki T. Historical review: Endothelin. *Trends Pharmacol Sci.* 4:219-24. 2004
- Mathison Y, del Garrido MR, Israel A. Multiple signaling pathways involved in the effect of endothelin type B receptor in rat median eminence. *Acta Biol Hung.* 58(2):139-50. 2007
- Mathison Y, Israel A. 2002. Role of endothelin type B receptor in NO/cGMP signaling pathway in rat median eminence. *Cell Mol Neurobiol.* 22(5-6):783-95.
- Mazzuca M, Khalil R Vascular endothelin receptor type B: Structure, function and dysregulation in vascular disease Mazzuca M, Khalil R *Biochemical Pharmacology* 84 (2012) 147–162
- Meister B. Neurotransmitters in key neurons of the hypothalamus that regulate feeding behavior and body weight. *Physiol Behav.* 92(1-2):263-71. 2007
- Moga MM, Moore RY. Organization of neural inputs to suprachiasmatic nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.* 389:508-34. 1997.
- Moore RY. Organization and function of the central nervous system circadian oscillator: The suprachiasmatic hypothalamic nucleus. *Fed. Proc.* 42:2783-9. 1984.
- Moreland S, McMullen DM, Delaney CL, Lee VG, Hunt JT. Venous smooth muscle contains vasoconstrictor ETB-like receptors. *Biochem Biophys Res Commun.* 184(1):100-6. 1992.
- Morgazo C, Perfume G, Legaz G, di Nunzio A, Hope SI, Bianciotti LG, Vatta MS. Involvement of nitric oxide pathways in short term modulation of tyrosine hydroxylase activity by endothelins 1 and 3 in the rat anterior hypothalamus. *Biochem Biophys Res Commun.* 334(3):796-802, 2005.
- Moreno-Aliaga, M.J., Lamas, O., Marti, A., Martinez, J.A.. Effects of a beta3-adrenergic agonist on glucose uptake and leptin expression and secretion in cultured adipocytes from lean and overweight (cafeteria) rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291,1201-1207. , 2002
- Moroi M, Fukazawa M, Ishikawa M, Aikawa J, Namiki A, Yamaguchi T. Effect of endothelin on angiotensin converting enzyme activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Gen Pharmacol.* 27(3):463-5. 1996.
- Morrison SF, Nakamura K, Madden CJ. Central control of thermogenesis in mammals. *Exp Physiol.* 93(7):773-97. 2008.
- Mosqueda-Garcia R, Appalsamy M, Fernandez-Violante R, Hamakubo T. Modulatory effects of endothelin on baroreflex activation in the nucleus of the solitary tract. *Eur J Pharmacol.* 19;351(2):203-7. 1998
- Motte, S., McEntee, K., Naeije, R. Endothelin receptor antagonists. *Pharmacol. Ther.* 110, 386–414, 2006.
- Muniyappa R, Yavuz S. Metabolic actions of angiotensin II and insulin: a microvascular endothelial balancing act. *Mol Cell Endocrinol.* 2013 Sep 25;378(1-2):59-69. doi: 10.1016/j.mce.2012.05.017. Epub 2012 Jun 7. Review.
- Muriel, P., Castañeda, G., Ortega, M., Noel, F. Insights into the mechanism of erythrocyte Na⁺ / K⁺-ATPase inhibition by nitric oxide and peroxynitrite anion. *J. Appl. Toxicol.* 23, 275-278. 2003.

- Nabhen SL, Morales VP, Guil MJ, Höcht C, Bianciotti LG, Vatta MS. Mechanisms involved in the long-term modulation of tyrosine hydroxylase by endothelins in the olfactory bulb of normotensive rats *Neurochem Int.* 58(2):196-205. 2010.
- Nabhen SL, Perfume G, Battistone MA, Rossi A, Abramoff T, Bianciotti LG, Vatta MS. Short-term effects of endothelins on tyrosine hydroxylase activity and expression in the olfactory bulb of normotensive rats. *Neurochem Res.* 34(5):953-63, 2009.
- Naicker S, Bhoola KD. Endothelins: vasoactive modulators of renal function in health and disease. *Pharmacol Ther.* 90(1):61-88. 2001.
- Naidoo V, Naidoo S, Raidoo DM. Immunolocalisation of endothelin-1 in human brain, *Journal of Chemical Neuroanatomy* 27. 193–200, 2004.
- Nambi P, Wu H, Ye D, Gagnon A, y Elshourbagy N. Characterization of a Novel Porcine EndothelinB Receptor Splice Variant *J Pharmacol Exp Ther.* 292(1):247-53, 2000.
- Neylon CB. Vascular biology of endothelin signal transduction. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 26(2):149-53. 1999.
- Nilsson D, Wackenfors A, Gustafsson L, Ugander M, Ingemansson R, Edvinsson L, Malmström M., PKC and MAPK signalling pathways regulate vascular endothelin receptor expression, *Eur J Pharmacol.* 580(1-2):190-200, 2008.
- Oaks and Sidhu .Synuclein modulation of monoamine transporters. *FEBS. Letters.* 2011.
- Oishi K¹, Ogawa Y, Gamoh S, Uchida MK Contractile responses of smooth muscle cells differentiated from rat neural stem cells. *J Physiol.* Apr 1;540(Pt 1):139-52. 2002
- Ondicova K, Kvetnansky R, Mravec B. Deafferentation of the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) exaggerates the sympathoadrenal system activity in stressed rats. *Endocr Regul.* 2014 Jul;48(3)
- Ono N, Kaneko M. Influences of beta-blocking agents on cardiovascular actions induced by endothelin-3 administered intracerebroventricularly in anesthetized rats. *Life Sci.* 57(4):345-53. 1995
- Ono K, Iwanaga Y, Mannami T, Kokubo Y, Tomoike H, Komamura K, Shioji K, Yasui N, Tago N, Iwai N. Epidemiological evidence of an association between SLC6A2 gene polymorphism and hypertension. *Hypertens Res* 26: 685–689, 2003
- Oparil S, Chen Y-F, Berecek KH, Calhoun DA, Wyss JM. The role of the central nervous system in hypertension. (Laragh JH and Brenner BM, Eds) *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management.* Second Ed., Raven Press, NY., Chapter 42, pp. 713-740, 1995.
- Oparil S, Chen YF, Peng N, Wyss JM. Anterior hypothalamic norepinephrine, atrial natriuretic peptide, and hypertension. *Front Neuroendocrinol.* 17(2):212-46. 1996.
- Opgendorff TJ, Kimira S, Wu-Wong JR. Characterization of endothelin- converting enzymes. *Methods in Neuroscience* 23:251-265, 1995.
- Owada A, Tomita K, Terada Y, Sakamoto H, Nonoguchi H, Marumo F. Endothelin (ET)-3 stimulates cyclic guanosine 3',5'-monophosphate production via ETB receptor by producing nitric oxide in isolated rat glomerulus, and in cultured rat mesangial cells. *J Clin Invest.* 93(2):556-63. 1994
- Papouchado ML, Vatta MS, Bianciotti LG, Fernández BE. Effects of atrial natriuretic factor on norepinephrine release evoked by angiotensins II and III in the rat adrenal medulla. *Arch Physiol Biochem.*;103(1):55-8. 1995
- Palkovits M, Brownstein M, Saavedra JM, Axelrod J. Norepinephrine and dopamine content of hypothalamic nuclei of the rat. *Brain Res.* 30;77(1):137-49. 1974.
- Palkovits, M., Brownstein, M.J. *Maps and Guide to Microdissection of the Rat Brain.* Elsevier, New York. 1988
- Patel JC, Witkovsky P, Avshalumov MV, Rice ME. Mobilization of calcium from intracellular stores facilitates somatodendritic dopamine release. *J Neurosci.* 29(20):6568-79. 2009.
- Paxinos G, Watson C. 1998. "The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates." Academic Press, San Diego.
- Pendergrass KD, Gwathmey TM, Michalek RD, Grayson JM, Chappell MC. 2009. The angiotensin II-AT1 receptor stimulates reactive oxygen species within the cell nucleus. *Biochem Biophys Res Commun.* 384(2):149-54.

- Peng N, Chambless BD, Oparil S, Wyss JM. Alpha2A-adrenergic receptors mediate sympathoinhibitory responses to atrial natriuretic peptide in the mouse anterior hypothalamic nucleus. *Hypertension*; 41(3):571-5. 2003.
- Penna C, Rastaldo R, Mancardi D, Capello S, Pagliaro P, Westerhof N, Losano G. 2006. Effect of endothelin on the cardiovascular system. *J Cardiovasc Med* 7: 645–652.
- Pérez-Alvarez MJ, Calcerrada MC, Hernández F, Catalán RE, Martínez AM. 2000. Endothelin-1 increases isoprenaline-enhanced cyclic AMP levels in cerebral cortex. *Regul Pept.* 88(1-3):41-6
- Perfume G, Morgazo C, Nabhen S, Batistone A, Hope SI, Bianciotti LG, Vatta MS. Short-term regulation of tyrosine hydroxylase activity and expression by endothelin-1 and endothelin-3 in the rat posterior hypothalamus. *Regul Pept.* 16;142(3):69-77, 2007.
- Perfume G, Nabhen SL, Barrera KR, Otero MG, Bianciotti LG, Vatta MS Long-term modulation of tyrosine hydroxylase activity and expression by endothelin-1 and -3 in the rat anterior and posterior hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 294(3):R905-14, 2008.
- Pfaff DW, Kieffer BL, Swanson LW. Mechanisms for the regulation of state changes in the central nervous system: an introduction. *Ann N Y Acad Sci.* 1129:1-7. 2008.
- Phillippu, A, Matthaei, H Transport and storage of catecholamines in vesicles. *Hamb. Exp. Pharmacol. Cap* 1: 1-4, 1988
- Plant TM. Hypothalamic control of the pituitary-gonadal axis in higher primates: key advances over the last two decades. *J Neuroendocrinol*; 20(6):719-26. 2008.
- Plant TD, Zöllner C, Kepura F, Mousa SS, Eichhorst J, Schaefer M, Furkert J, Stein C, Oksche A. Endothelin potentiates TRPV1 via ETA receptor-mediated activation of protein kinase C. *Mol Pain.* 2007 Nov 14;3:35.
- Plato CF, Pollock DM, Garvin JL. 2000. Endothelin inhibits thick ascending limb chloride flux via ET(B) receptor-mediated NO release. *Am J Physiol Renal Physiol.* 279(2):F326-33.
- Pollock DM, Divish BJ, Milicic I, Novosad EI, Burres NS, Opgenorth TJ. 1993. In vivo characterization of a phosphoramidon-sensitive endothelin-converting enzyme in the rat. *Eur J Pharmacol.* 231(3):459-64.
- Pollock DM, Pollock JS. Evidence for endothelin involvement in the response to high salt. *Am J Physiol Renal Physiol.* 281:F144–F150. 2001 (a)
- Pollock DM. Contrasting pharmacological ETB receptor blockade with genetic ETB deficiency in renal responses to big ET-1. *Physiol Genomics.* 6:39–43. 2001 (b)
- Pollock JS, Pollock DM. Endothelin and NOS1/nitric oxide signaling and regulation of sodium homeostasis. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 17(1):70-5, 2008.
- Priest, R.M., Hucks, D., Ward, J.P. Noradrenaline, beta-adrenoreceptor mediated vasorelaxation and nitric oxide in large and small pulmonary arteries of the rat. *Br. J. Pharmacol.* 122,1375-1384. 1997.
- Qian JY, Leung A, Harding P, LaPointe MC. 2006. PGE2 stimulates human brain natriuretic peptide expression via EP4 and p42/44 MAPK. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 290(5):H1740-6.
- Quick MW. The role of SNARE proteins in trafficking and function of neurotransmitter transporters. *Handb Exp Pharmacol.* 2006;(175):181-96. Review.
- Ramamoorthy S, Shippenberg TS, Jayanthi LD. Regulation of monoamine transporters: Role of transporter phosphorylation. *Pharmacol Ther.* 129(2):220-38. Review. 2011
- Rautureau Y, Schiffrin EL. Endothelin in hypertension: an update. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2012 Mar;21(2):128-36. Review.
- Rebuffat P, Macchi C, Malendowicz LK, Nussdorfer GG. 2000. Comparison of the signaling mechanisms involved in the ETB receptor-mediated secretagogue action of endothelin-1 on dispersed zona glomerulosa cells and capsule-zona glomerulosa preparations of the rat adrenal gland. *Int J Mol Med.* 5(1):43-7.
- Reiser G. 1990 Endothelin and a Ca²⁺ ionophore raise cyclic GMP levels in a neuronal cell line via formation of nitric oxide. *Br J Pharmacol.* 101(3):722-6.
- Reith ME, Zhen J, Chen N. The importance of company: Na⁺ and Cl⁻ influence substrate interaction with SLC6 transporters and other proteins. *Handb Exp Pharmacol.* (175):75-93. Review. 2006.

- Resink TJ, Scott-Burden T, Bühler FR.. Activation of multiple signal transduction pathways by endothelin in cultured human vascular smooth muscle cells. *Eur J Biochem.* 189(2):415-21. 1996
- Risold PY.. The Septal Region. In "The Rat Nervous System". Paxinos, G., Ed., 3rd ed., Elsevier, San Diego. 2003
- Rizo J, Südhof TC. Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion. *Nat Rev Neurosci.*;3(8):641-53. Review. 2002
- Roberts KM, Fitzpatrick PF Mechanisms of tryptophan and tyrosine hydroxylase. *IUBMB Life* 65(4):350–357 (2013)
- Robertson IH. A noradrenergic theory of cognitive reserve: implications for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 34(1):298-308.2013.
- Robinson MB. Signaling pathways take aim at neurotransmitter transporters. *Sci STKE.* 4;2003(207):pe50. 2003
- Rodríguez-Campos, M., Kadarian, C., Rodano, V., Bianciotti, L.G., Fernández, B., Vatta, M., 2000. AT-1 receptor and phospholipase C are involved in angiotensin III modulation of hypothalamic noradrenergic transmisión. *Cell. Mol. Neurobiol.* 20,747-762.
- Rodríguez MR, Sabbatini ME, Santella G, Dabas P, Villagra A, Vatta MS, Bianciotti LG. 2005. ET-3 applied to the brain evokes opposite effects on bile secretion mediated by a central nitric oxide pathway. *Peptides.* 26(7):1219-27.
- Rodríguez-Pascual F, Ferrero R, Miras-Portugal MT, Torres M. 1999. Phosphorylation of tyrosine hydroxylase by cGMP-dependent protein kinase in intact bovine chromaffin cells. *Arch Biochem Biophys.* 366(2):207-14.
- Rossi GP, Andreis PG, Colonna S, Albertin G, Aragona F, Belloni AS, Nussdorfer GG. 2002. Endothelin-1[1-31]: a novel autocrine-paracrine regulator of human adrenal cortex secretion and growth. *J Clin Endocrinol Metab.* 87(1):322-8.
- Rossi NF, Beierwaltes WH. 2006. Nitric oxide modulation of ET(B) receptor-induced vasopressin release by rat and mouse hypothalamo-neurohypophyseal explants. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 290(5):R1208-15.
- Rossi NF, Chen H. 2002. Modulation of ET(B) receptor-induced arginine-vasopressin secretion by N-methyl-D-aspartate (NMDA) and gamma-aminobutyric acid (GABA)-dependent mechanisms in hypothalamo-neurohypophysial explants. *Clin Sci.*103 (48):162S-6
- Rossi NF. 2004. Regulation of vasopressin secretion by ETA and ETB receptors in compartmentalized rat hypothalamo-neurohypophysial explants. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 286(4):E535-41
- Rudnick G, Krämer R, Blakely RD, Murphy DL, Verrey F. The SLC6 transporters: perspectives on structure, functions, regulation, and models for transporter dysfunction. *Pflugers Arch.* 2014 Jan;466(1):25-42. doi: 10.1007/s00424-013-1410-1. Epub 2013 Dec 13. Review.
- Saita Y, Yazawa H, Koizumi T, Morita T, Tamura T, Takenaka T, Honda K. 1998. Mitogenic activity of endothelin on human cultured prostatic smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol.* 349(1):123-8.
- Samuvel DJ, Jayanthi LD, Bhat NR, Ramamoorthy S. A role for p38 mitogen-activated protein kinase in the regulation of the serotonin transporter: evidence for distinct cellular mechanisms involved in transporter surface expression. *J. Neurosci.* 25:29–4. 2005..
- Saper CB. 2003. Central Autonomic Nervous System. In "The Rat Nervous System" (Paxinos, G., Ed.), 3rd ed, San Diego.
- Satoh, M., Yamamoto, Y., Takayanagi, I.. Characterization of endothelin receptor subtypes mediating Ca²⁺ mobilization and contractile response in rabbit iris dilator muscle. *Br. J. Pharmacol.* 117, 1277-1285. 1996
- Scheibner, J., Trendelenburg A.U., Hein, L., Starke, K. Alpha2-adrenoreceptors modulating neuronal serotonin release: a study in alpha2-adrenoreceptor subtype-deficient mice. *Br. J. Pharmacol.* 132,925-933., 2001.
- Schneider MP, Boesen EI, Pollock DM. Contrasting actions of endothelin ET(A) and ET(B) receptors in cardiovascular disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 47:731-59. 2007.

- Schroeder C, Jordan J. Norepinephrine transporter function and human cardiovascular disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012 Dec 1;303(11):H1273-82. Review. 2012
- Schroeter S, Apparsundaram S, Wiley RG, Miner LH, Sesack SR, Blakely RD. Immunolocalization of the cocaine- and antidepressant-sensitive l-norepinephrine transporter. *J Comp Neurol.* 1;420(2):211-32. 2000
- Schuman EM, Madison DV. Nitric oxide and synaptic function. *Annu Rev Neurosci.* 17:153-83. 1994.
- Shakiryanova D, Tully A, Hewes RS, Deitcher DL, Levitan ES. *Nat Neurosci.* 8(2):173-8. Activity-dependent liberation of synaptic neuropeptide vesicles. 2005
- Sheng ZH, Rettig J, Cook T, Catterall WA. Calcium-dependent interaction of N-type calcium channels with the synaptic core complex. *Nature.* 1;379(6564):451-4. 1996
- Shimada K, Matsushita Y, Wakabayashi K, Takahashi M, Matsubara A, Iijima Y, Tanzawa K. 1995. Cloning and functional expression of human endothelin-converting enzyme cDNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 207(2):807-12.
- Shraga-Levine Z, Sokolovsky M. 2000. Functional coupling of G proteins to endothelin receptors is ligand and receptor subtype specific. *Cell Mol Neurobiol.* 20: 305–17.
- Simaan J, Sabra R. In-vivo evidence of a role for nitric oxide in regulating the activity of the norepinephrine transporter. *Eur J Pharmacol.* Dec 5;671(1-3):102-6. 2011
- Smith JK, Barron KW. 1989. Posterior hypothalamic influences on cardiovascular effects of aortic nerve stimulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 257(6 Pt 2):H1994-2000.
- Smrcka AV, Brown JH, Holz GG. *Cell Signal.* 2012 Jun;24(6):1333-43. Role of phospholipase C ϵ in physiological phosphoinositide signaling networks. 2012
- Sokolovski, Endothelin receptor subtypes and their role in transmembrane signaling mechanisms, 1995.
- Sokolovsky M. 1993. Endothelin receptors in rat cerebellum: activation of phosphoinositide hydrolysis is transduced by multiple G-proteins. *Cell Signal.* 5(4):473-83
- Sokolovsky M. 1995. Endothelin receptor subtypes and their role in transmembrane signaling mechanisms. *Pharmacol Ther.* 68(3):435-71.
- Sokolovsky M. Endothelin receptor heterogeneity, G-proteins, and signaling via cAMP and cGmp cascade. *Cellular and molecular Neurobiology, Vol.15 , N $^{\circ}$ 5, 1995.*
- Speed JS, Pollock DM. Endothelin, kidney disease, and hypertension. *Hypertension.* Jun;61(6):1142-5 2013
- Stojilkovic SS, Catt KJ. Novel aspects of GnRH-induced intracellular signaling and secretion in pituitary gonadotrophs. *J Neuroendocrinol.* 7(10):739-57. Review. 1995
- Stoddard SL, Bergdall VK. Increases in adrenolumbar venous flow and epinephrine secretion elicited by preoptic and hypothalamic stimulation in the cat. *Neuroendocrinology.* 1992 May;55(5):583-90.
- Südhof TC. Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron.* 80(3):675-90 2013
- Sung, D., Huang, A., Mital, S., Kichuk, M.R., Marboe, C.C., Addonizio, L.J., Michler, R.E., Koller, A., Hintze, T.H., Kaley, G. Norepinephrine elicits beta2-receptor-mediated dilation of isolated human coronary arterioles. *Circulation* 106,550-555. , 2002.
- Sung, U. y Blakely R.D. Calcium-dependent interactions of the human norepinephrine transporter with syntaxin 1A. *Mol. Cell. Neurosci.* 34. 251–260. 2007
- Swanson LW. The hypothalamus. In "Handbook of Chemical Neuroanatomy" Vol.5, Part I, pp. 1-124. Elsevier, Amsterdam/ New York. 1987.
- Swanson LW. "Brain Maps: Structure of the Rat Brain." Elsevier, Amsterdam. 1998
- Szczepańska-Sadowska E. Neuropeptides in neurogenic disorders of the cardiovascular control. *J Physiol Pharmacol.* 57 (11):31-53. 2006
- Szego EM, Barabás K, Balog J, Szilágyi N, Korach KS, Juhász G, Abrahám IM. Estrogen induces estrogen receptor alpha-dependent cAMP response element-binding protein phosphorylation via mitogen activated protein kinase pathway in basal forebrain cholinergic neurons in vivo. *J Neurosci.* 26(15):4104-10. 2006.

- Takekoshi K, Ishii K, Shibuya S, Kawakami Y, Isobe K, Nakai T. Stimulation of catecholamine biosynthesis via the protein kinase C pathway by endothelin-1 in PC12 rat pheochromocytoma cells. *Biochem Pharmacol.* 63(5):977-84. 2002.
- Tanabe M, Kino Y, Honda M, Ono H. Presynaptic I1-imidazoline receptors reduce GABAergic synaptic transmission in striatal medium spiny neurons. *J Neurosci.* 26(6):1795-802. 2006.
- Tanaka, H., Kannari, K., Maeda, T., Tomiyama, M., Suda, T., and Matsunaga, M.). Role of sero-tonergic neurons in L-DOPA-derived extracellular dopamine in the striatum of 6-OHDA-lesioned rats. *Neuroreport* 10, 631–634. (1999)
- Tanaka M, Kawahara K, Kosugi T, Yamada T, Mioka T.. Changes in the spontaneous calcium oscillations for the development of the preconditioning-induced ischemic tolerance in neuron/astrocyte co-culture. *Neurochem Res.* 32(6):988-1001. 2007
- Teixeira CE, Priviero FB, Todd J Jr, Webb RC.. Vasorelaxing effect of BAY 41-2272 in rat basilar artery: involvement of cGMP-dependent and independent mechanisms.. *Hypertension.* 47(3):596-602. 2006
- Tekin I, Roskoski R Jr, Carkaci-Salli N, Vrana KE.Complex_molecular regulation of tyrosine hydroxylase.J *Neural Transm.* 2014 Dec;121(12):1451-81. doi: 10.1007/s00702-014-1238-7.
- Tejani-Butt SM. [3H]nisoxetine: a radioligand for quantitation of norepinephrine uptake sites by autoradiography or by homogenate binding. *J Pharmacol Exp Ther* 260:427–36. 1992
- Than Than S, Mekaru C., Seki N., Hidaka K.,Ueno A., ThidarMyint H, Kuwayam. H. Endogenous ghrelin released in response to endothelin stimulates growth hormone secretion in cattle. *Domestic Animal Endocrinology* 38 (2010)
- Tipsmark, C.K., Madsen, S.S. Regulation of Na⁺ / K⁺-ATPase activity by nitric oxide in the kidney and gill of the brown trout (*Salmo Trutta*). *J. Exp. Biol.* 206, 1503-1510. 2003
- Torok, T.L., Nagykalldi, Z., saska, Z., Kovacs, T., Nada, S.A., Zillikens, S., Magyar, K., Sylvester, Vizi, E. Presynaptic alpha2-receptors regulate reverse Na⁺/Ca²⁺-exchange and transmitter release in Na⁺-loaded peripheral sympathetic nerves. *Neurochem. Int.* 45,699-711, 2004
- Torres G y Amara SG. Glutamate and monoamine transporters: new visions of form and function. *Current Opinion in Neurobiology.* 17:304–312. 2007.
- Torres, G.E., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G.Plasma membrane monoamine transporters: Structure, regulation and function, *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 13-25. 2003.
- Tsumori T, Yokota S, Qin Y, Oka T, Yasui Y. 2006. A light and electron microscopic analysis of the convergent insular cortical and amygdaloid projections to the posterior lateral hypothalamus in the rat, with special reference to cardiovascular function. *Neurosci Res.* 56(3):261-9.
- Tulapurkar ME, Zündorf G, Reiser G. 2006. Internalization and desensitization of a green fluorescent protein-tagged P2Y nucleotide receptor are differently controlled by inhibition of calmodulin-dependent protein kinase II. *J.Neurochem.* 96(3):624-34.
- Tykocki NR, Watts SW. The interdependence of endothelin-1 and calcium: a review. *Clin Sci (Lond)*;119(9):361-72. doi: 10.1042/CS20100145. Review. 2010
- Uchida, J., Kiuchi, Y., Ohno, M., Yura, A., Oguchi, K. Ca (2+)-dependent enhancement of [3H]noradrenaline uptake in PC12 cells through calmodulin-dependent kinases. *Brain Res.* 809, 155-164.
- van den Buuse M, Webber KM. 2000. Endothelin and dopamine release. *Prog Neurobiol.* 60(4):385-405.
- Vatta M. S., Bianciotti L. G., Perfume G., Nabhen S. L., Hope S. I. Riquelme Barrera K. Function of neuropeptides at Central Nervous System, Cap 6: Endothelin: A family of peptides with multiple biological functions. Editor: Georgina Rodríguez de Lores Arnaiz. 149 – 169, 2009
- Vatta MS, Presas M, Bianciotti LG, Zarrabeitia V, Fernandez BE. B and C types natriuretic peptides modulate norepinephrine uptake and release in the rat hypothalamus. *Regul. Pept.*, 65:175-184, 1996.
- Vatta MS, Rodríguez-Fermepin M, Durante G, Bianciotti LG, Fernandez BE. 1999. Atrial natriuretic factor inhibits norepinephrine biosynthesis and turn over on the rat hypothalamus. *Regul Pept* 85: 101–7.
- Vatta MS, Hope SI, Prendes GM, Bianciotti LG, Elverdin JC, Fernandez BE.Salivary glands and noradrenergic transmission in diabetic rats. *Auton Autacoid Pharmacol.* 2002 Apr;22(2):65-71.

- Vatta, M., Peña, C., Fernández, B.E., Rodríguez de Lores Arnaiz, G. 2004. Endobain E, a brain N⁺, K⁺-ATPase inhibitor, decreases norepinephrine uptake in the rat hypothalamus. *Life Sci.* 76, 359-365.
- Vatta, M.S., Bianciotti, L.G., Fernández, B. E. 1993. Atrial natriuretic peptide and bradykinin interaction on norepinephrine uptake in rat adrenal medulla. *Arch. Int. Physiol. Biochim. Biophys.* 101, 129-132.
- Vatta, M.S., Bianciotti, L.G., Locatelli, A.S., Papouchado, M.L., Fernández, B.E. 1992. Monophasic and biphasic effects of angiotensin II and III on norepinephrine uptake and release in rat adrenal medulla. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 70, 821-825.
- Vaughan RA. Phosphorylation and regulation of psychostimulantsensitive neurotransmitter transporters. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 310:1-7. 2004.
- Vayssettes-Courchay, C., Bouysset, F., Cordi, A., Laubie, M., Verbeuren, T.J.,. Effects of medullary alpha2-adrenoreceptor blockade in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 453,287-297. 2002
- Vecchione, C., Fratta, L., Rizzoni, D., Notte, A., Poulet, R., Porteri, E., Frati, G., Guelfi, D., Trimarco, V., Mulvany, M.J., Agabiti-Rosei, E., Trimarco, B., Cotecchia, S., Lembo, G., Cardiovascular influence of alpha1b-adrenergic receptor defect in mice. *Circulation* 105,1700-1707. 2002.
- Verma A, Hirsch DJ, Snyder SH. 1992. Calcium pools mobilized by calcium or 1, 4, 5- triphosphate are differentially localizes in rat heart and brein. *Mol. Biol. Cell.* 3:621-631.
- Vertes RP. 1992. PHA-L analysis of projections from supramammillary nucleus in the rat. *J Comp Neurol.* 326:595-622.
- Vierimaa H, Ronkainen J, Ruskoaho H, Vuolteenaho O. 2006. Synergistic activation of salmon cardiac function by endothelin and beta-adrenergic stimulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 291(3):H1360-70
- Watts SW. Endothelin receptors: what's new and what do we need to know? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 298(2):R254-60. Review. 2010
- Watts VL, Sepulveda FM, Cingolani OH, Ho AS, Niu X, Kim R, Miller KL, Vandegaer K, Bedja D, Gabrielson KL, Rameau G, O'Rourke B, Kass DA, Barouch LA. Anti-hypertrophic and anti-oxidant effect of beta3-adrenergic stimulation in myocytes requires differential neuronal NOS phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol.* 2013 Sep;62:8-17.
- Wang D, Wang H, Wu G, Yang Y, Yang J, Liu C, Wong TM. 2009. Pharmazie Protein kinase C mediates the effects of delta-opioid receptor stimulation on survival and apoptosis in neonatal cardiomyocytes cultured in serum-deprived condition. *64(7):466-71.*
- Warner TD, Schmidt HH, Kuk J, Mitchell JA, Murad F. 1992. Human brain contains a metalloprotease that converts big endothelin-1 to endothelin-1 and is inhibited by phosphoramidon and EDTA. *Br J Pharmacol.* 106(3):505-6.
- Watanabe, T., Kusumoto, K., Kitayoshi, T., Shimamoto, N., 1989. Positive inotropic and vasoconstrictive effects of endothelin-1 in in vivo and in vitro experiments: characteristics and the role of L-type calcium channels. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 13,S108-S111.
- Watson RE, Supowit SC, Zhao H, Katki KA, Dipette DJ. "Role of sensory nervous system vasoactive peptides in hypertension".*Braz J Med Biol Res.* 2002 Sep;35(9):1033-45
- Webber KM, Pennefather JN, Head GA, van den Buuse M. 1998. Endothelin induces dopamine release from rat striatum via endothelin-B receptors. *Neuroscience.* 86(4):1173-80.
- Weiner E, Scarpa A. 1989. Activation of protein kinase C modulates the adenylate cyclase effector system of B-lymphocytes. *J Biol Chem.* 264(8):4324-8.
- Wengue y Bönisch. The Role of Cysteines and Histidins of the Norepinephrine Transporter.*Neurochem Res* 38:1303-1314(2013)
- Wersinger C, Jeannotte A, Sidhu A. Attenuation of the norepinephrine transporter activity and trafficking via interactions with alpha-synuclein. *Eur J Neurosci.* 24(11):3141-52, 2006.
- Weinshenker D, White SS, Javors MA, Palmiter RD, Szot P. Regulation of norepinephrine transporter abundance by catecholamines and desipramine in vivo. *Brain Res.*;946(2):239-46. 2002

- Winkler, H., Schmidt, W., Fischer-Colbrie, R., Weber, A. Molecular mechanisms of neurotransmitter storage and release a comparison of the adrenergic and cholinergic systems. *Prog. Brain Res.* 58,11-20. 1983
- Wyss JM, Carlson SH. 2001. The role of the nervous system in hypertension. *Curr Hypertens Rep* 3: 255–262.
- Xia Y, Krukoff TL. Differential neuronal activation in the hypothalamic paraventricular nucleus and autonomic/neuroendocrine responses to I.C.V. endotoxin. *Neuroscience.* 121(1):219-31. 2003
- Xiaohong, W., Jun, Y., Lijia, T., Jingyi, S., Chaoshu, T., Naikui, LC-type natriuretic peptide inhibits upregulation of α 1-adrenoreceptor and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in rat vascular smooth muscle after vascular endothelial injury. *Chin. Med. Sci. J.* 15,73-78, 2000.
- Xu L, Chen X, Sun B, Sterling C, Tank AW. Evidence for regulation of tyrosine hydroxylase mRNA translation by stress in rat adrenal medulla. *Brain Res.* 1158:1-10. 2007
- Yamada K, Kushiku K, Yamada H, Katsuragi T, Furukawa T, Noguchi H, Ono N. 1999. Contribution of nitric oxide to the presynaptic inhibition by endothelin ETB receptor of the canine stellate ganglionic transmission. *J Pharmacol Exp Ther.* 290(3):1175-81.
- Yamaguchi N. Role of ET(A) and ET(B) receptors in endothelin-1-induced adrenal catecholamine secretion in vivo. *Am J Physiol.* 272(4 Pt 2):R1290-7. 1997
- Yamamoto T, Uemura H. Distribution of endothelin-B receptor like immunoreactivity in rat brain, kidney, and pancreas. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 31(Suppl. 1):S207-S211, 1998.
- Yamamoto T¹, Ono K, Hitomi S, Harano N, Sago T, Yoshida M, Nunomaki M, Shiiba S, Watanabe S, Nakanishi O, Inenaga. Endothelin receptor-mediated responses in trigeminal ganglion neurons. *J Dent Res.* 2013 Apr;92(4):335-9. 2013
- Yamasaki H, Niwa M, Yamashita K, Kataoka Y, Shigematsu K, Hashiba K, Ozaki M. 1989. Specific 125I-endothelin-1 binding sites in the atrioventricular node of the porcine heart. *Eur J Pharmacol.* 168(2):247-50.
- Yamashita A, Singh SK, Kawate T, Jin Y, Gouaux E. Crystal structure of a bacterial homologue of Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporters. *Nature* 437:215–23. 200
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. 1988. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature.* 332(6163):411-5.
- Yeung PK, Shen J, Chung SS, Chung SK Targeted over-expression of endothelin-1 in astrocytes leads to more severe brain damage and vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *BMC Neurosci.* 2013 Oct 25;14:131.
- Youdim, M.B., Riederer, P., Monoamine oxidase B; a misunderstood and misjudged enzyme. *Pharmacol. Res. Commun.* 20,9-14. 1988.
- Yoneyama, T., Hori, M., Tanaka, T., Matsuda, Y., Karaki, H. 1995 a. Endothelin ETA and ETB receptors facilitating parasympathetic neurotransmission in the rabbit trachea. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 275, 1084-1089.
- Zahniser, N. R. & Doolen, S. Chronic and acute regulation of Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporters: drugs, substrates, presynaptic receptors, and signaling systems. *Pharmacol. Ther.* 92, 21–55 (2001).
- Zeng Q, Li X, Zhong G, Zhang W, Sun C. Endothelin-1 induces intracellular [Ca²⁺] increase via Ca²⁺ influx through the L-type Ca²⁺ channel, Ca²⁺-induced Ca²⁺ release and a pathway involving ET A receptors, PKC, PKA and AT1 receptors in cardiomyocytes. *Sci China C Life Sci.* 52(4):360-70, 2009.
- Zigmond RE, Schwarzschild MA, Rittenhouse AR. 1989. Acute regulation of tyrosine hydroxylase by nerve activity and by neurotransmitters via phosphorylation. *Annu Rev Neurosci.* 12:415–61.
- Zolk O, Ott C, Fromm MF, Schmieder RE. Effect of the rs168924 single-nucleotide polymorphism in the SLC6A2 catecholamine transporter gene on blood pressure in Caucasians. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 14: 293–298, 2012.

- Zwart R, Verhaagh S, Buitelaar M, Popp-Snijders C, Barlow DP. Impaired activity of the extraneuronal monoamine transporter system known as uptake-2 in Orct3/Slc22a3-deficient mice. Mol Cell Biol. 2001 Jul;21

Resumen

En el presente trabajo de tesis, demostramos que las endotelinas-1 y -3 (ET-1 y ET-3) se comportan como neuropéptidos moduladores de la actividad del transportador de noradrenalina (NET) en el hipotálamo anterior y posterior de ratas normotensas. La regulación del mismo por las ETs es compleja e involucra diferentes subtipos de receptores de ETs, incluyendo los llamados no convencionales o atípicos y múltiples vías de señalización.

En el hipotálamo anterior se observa que la ET-1 disminuye la captación neuronal de noradrenalina (NA) a expensas de la reducción de la actividad del NET debido a una disminución en los sitios de unión. Las modificaciones producidas en la actividad del NET son específicamente sobre la capacidad máxima de transporte de NA o sea número de transportadores funcionales sin alterar su afinidad. El efecto inhibitorio de la ET-1 es mediado por el receptor ET_B e involucra diferentes vías que incluyen la NOS neuronal, la PKA y la PKC. En general estas vías activan los sitios de fosforilación del transportador en los aminoácidos serina y tirosina interactuando entre Sintaxina A1 y NET. Esto produce la regulación del transportador en la superficie neuronal aumentando la internalización del NET, por lo tanto disminuye su número en la membrana de la terminal nerviosa. En esta misma región hipotalámica, la ET-3 incrementa la captación neuronal de NA por aumento de la actividad del NET debido a un incremento del número de transportadores expresados en la membrana de la neurona. Este efecto se basa en una movilización del NET desde los compartimentos intracelulares hacia la superficie de la membrana. Este neuropéptido ejercería su efecto a través de la activación de un receptor atípico o no convencional el cual está acoplado a una proteína G. La activación del complejo receptor atípico/proteína G involucra diferentes mecanismos intracelulares Ca²⁺ dependientes.

En el hipotálamo posterior, ambos neuropéptidos disminuyen la captación neuronal de NA a expensas de la reducción de la actividad del NET como consecuencia de una disminución en los sitios de unión. Este efecto es consecuencia de un incremento en la internalización del transportador desde la superficie de la membrana neuronal hacia los depósitos intracelulares. En el caso de la ET-1 el efecto inhibitorio es mediado por el receptor ET_B unido a proteína G y la ET-3 a través de la activación de un receptor atípico o no convencional el cual está acoplado a una proteína G. En ambas situaciones, independientemente del receptor que se active, el efecto inhibitorio de ambas ETs involucra diferentes vías intracelulares que incluyen a la NOS neuronal,

PKA y PKC. Esto produciría el mismo efecto descrito previamente en el caso de la ET-1 en el hipotálamo anterior.

Sobre la base de los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral sumado a los trabajos previos de nuestro grupo permiten demostrar contundentemente que tanto la ET-1 como la ET-3 se comportan como neuromoduladores de la transmisión noradrenérgica en el hipotálamo anterior como en el posterior, de animales normotensos, a través de la regulación de tres procesos importantes, la actividad del NET, la regulación de la liberación neuronal de NA y la actividad y expresión de la tirosina hidroxilasa. Por lo tanto, y a la luz de todos estos resultados, podemos inferir que los efectos producidos por las ETs a nivel central sobre la fisiología cardiovascular son consecuencia de la reducción en la simpatoinhibición a nivel del hipotálamo anterior y un incremento de la simpatoexcitación del hipotálamo posterior. Todo esto daría respuesta al aumento de la actividad simpática central, producido por las ETs, que fuera observado por diversos autores.

Summary

In this thesis, we show that endothelin-1 and -3 (ET-1 and ET-3) behave as neuropeptides regulating the activity of the norepinephrine transporter (NET) in the anterior and posterior hypothalamus of normotensive rats. The regulation is complex and involves different ET receptor subtypes, including the so called non-conventional or atypical receptors as well as multiple signaling pathways.

In the anterior hypothalamus ET-1 reduces neuronal norepinephrine (NE) uptake by decreasing the number of functional transporters without altering its affinity. The inhibitory effect of ET-1 is mediated by ET_B receptors and involves different signaling pathways including NOS, PKA and PKC. These pathways induce the phosphorylation at serine and tyrosine sites which favor NET interaction with syntaxin A1 leading to NET internalization and thereby decreasing the number of binding sites at the membrane surface of nerve terminals. Nevertheless, in the same hypothalamic region, ET-3 increases neuronal NE uptake and thus NET activity by increasing the number of transporters available at the neuronal membrane. This occurs as the result of NET mobilization from intracellular compartments to the membrane surface. ET-3 exerts its effect through the activation of an atypical or non-conventional ET receptor which is coupled to a G protein. The activation of atypical ET receptor / G protein involves different intracellular calcium-dependent mechanisms.

In the posterior hypothalamus both endothelins decrease NE uptake by reducing NET activity as the result of diminished binding sites at the neuronal membrane. This is achieved because both endothelins favor NET internalization to intracellular compartments. ET-1 response is mediated by ET_B receptors whereas that of ET-3 by the activation of an atypical or non-conventional ET receptor coupled to a G protein. Regardless which receptor is activated, both endothelins activate the same intracellular pathways including neuronal NOS, PKA and PKC leading to the same response as that of ET-1 in the anterior hypothalamus.

Present findings together with previous studies from our laboratory strongly support that both ET-1 and ET-3 behave as neuromodulators of noradrenergic transmission in the anterior and posterior hypothalamus of normotensive rats through the regulation of three major steps: NET activity (as shown in the present thesis), neuronal NE release and tyrosine hydroxylase activity and expression.

In the light of these results we propose that the regulation of cardiovascular physiology induced by brain ETs is mediated by the decreased sympathoinhibition of the anterior hypothalamus and the increased sympathoexcitation of the anterior hypothalamus. Thus, our findings may explain the net increase in the central sympathetic activity mediated by ETs described by several authors.